

Title	プロスタグランジンE受容体サブタイプ欠損マウスの作製とその表現型の解析(Dissertation_全文)
Author(s)	瀬木, 恵里
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2000-03-23
URL	http://dx.doi.org/10.11501/3167240
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	author

プロスタグランジン E 受容体サブタイプ欠損マウスの
作製とその表現型の解析

2000

瀬木 恵里

目次

緒言	-1-
第一章 プロスタグランジン E 受容体欠損マウスを用いた 生理機能の解析に関する研究	
(要約)	-6-
(実験結果)	-8-
(考察)	-38-
結語	-45-
実験方法の部	-47-
謝辞	-51-
発表論文目録	-52-
参考文献	-53-

緒言

プロスタノイドはプロスタグランジン (PG) とトロンボキサンよりなり、様々な生理作用を持つ一群の生理活性脂質である。プロスタノイドは細胞外からの刺激に応じて活性化するホスホリパーゼ A_2 の作用より、膜リン脂質から切り出されるアラキドン酸を基質として、シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase; COX) の働きで産生される共通前駆体である PGH_2 を介して各種の PG 変換酵素の作用で産生される。プロスタグランジンの1つであり、生体内でもっとも大量にかつ広範囲の組織で産生される PGE_2 は、 PGH_2 から PGE 変換酵素によって生成され、細胞外に分泌され、産生細胞自身やその周辺細胞の細胞膜上に存在する受容体と結合して作用を発揮する (Fig. 1) (1)。種々のアゴニスト・アンタゴニストを用いる薬理学的研究により、まず、 PGE 受容体には情報伝達を異にする4種類のサブタイプ ($EP1$ 、 $EP2$ 、 $EP3$ 、 $EP4$ と分類) が存在することが明らかにされた。すなわち、 $EP1$ は細胞内 Ca 上昇系、 $EP2$ と $EP4$ は $cAMP$ 上昇系、 $EP3$ は $cAMP$ 減少系にそれぞれ共役する (2, 3)。近年、4種類の PGE 受容体サブタイプの遺伝子クローニングが行われ、発現細胞を用いての受容体の構造とリガンド結合特異性、共役 G 蛋白、情報伝達系、イソフォームの有無などの生化学的性質 (Table 1)、また、Northern blot や in situ hybridization によってマウスの組織・細胞における受容体 mRNA の発現部位の同定 (Fig. 2)、さらには、遺伝子の発現調節機構の解析などが行われている (4)。薬学的観点からは、これらの研究成果は、各 PGE サブタイプ受容体に対する選択性の高いアナログの合成を可能とするばかりではなく、薬剤の代謝、適用に必要な生体情報を与えるものである。しかし、各サブタイプ受容体に対する選択性の高いアゴニスト、アンタゴニストが十分に利用できない現状においては、各サブタイプ受容体が生体内においてどのような生理条件下で機能するのか、その機能は個体レベルでの生体作用でどれほどに重要であるかに、などについては明らかにすることは非常に困難である。そこで、この問題にアプローチするためには、明らかにされた PGE 受容体の遺伝子操作

により、PGE 受容体遺伝子を欠損するノックアウトマウスを作製し、それを用いた研究の遂行が最適であり、緊急の課題とされた。

そこで筆者は、各々の PGE 受容体サブタイプ遺伝子を欠損させたマウスを作製し、それらの表現型の逐一的な解析を行うことを目的として本研究を実施した。その結果、4 種類の PGE 受容体欠損マウスの作製に成功し、それらの表現型として、EP4 受容体欠損マウスは新生児死亡を起こすことを発見した (5)。また、EP3 受容体欠損マウスは免疫性発熱に無応答になること (6)、EP2 受容体欠損マウスは排卵・受精の過程に異常が発症すること (7) を明らかにすることができた。これらの成果は、個体レベルでの PGE₂ 作用を示すものであり、今後のPGE誘導体の開発領域に有益な基礎的知見として寄与するものである。

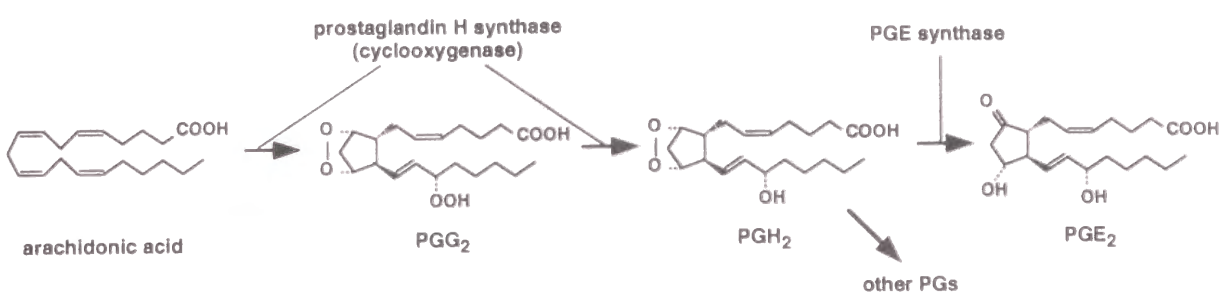


Fig. 1. Biosynthesis of PGE₂. PGE₂ is synthesized from arachidonic acid by the actions of prostaglandin H synthase (cyclooxygenase) and PGE synthase (PGE isomerase).

Table 1. Molecular and biochemical properties of the prostaglandin E receptor subtypes.

Receptor Type	Amino Acids	Kd (nM) [3H]PGE2	Rank Order of Binding Affinity	Signaling G protein	Gene Locus	Isoforms
EP1	405	21	PGE2 > I2 > E1 >> F2α	[Ca ²⁺]↑ G(?)	19p13.1 (human) chr 8 (mouse)	2 (rat)
EP2	362	27	PGE2 = E1 >> I2 > F2α, D2	cAMP↑ Gs	not identified	None
EP3	365	3	PGE2 = E1 >> I2 > D2 > F2α	cAMP↓ [Ca ²⁺]↑ Gi (Gq, Gs)	1p31.2 (human) chr 3 (mouse)	7 (human) 3 (mouse)
EP4	513	11	PGE2 = E1 >> I2, F2α, D2	cAMP↑ Gs	5p13.1 (human) chr 15 (mouse)	None

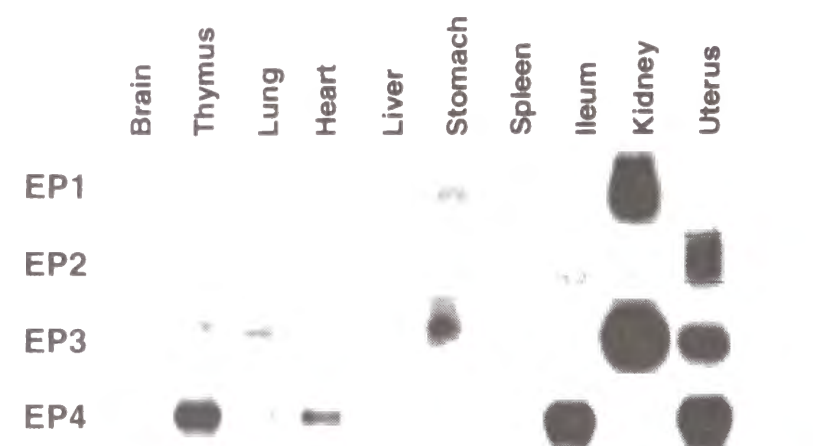


Fig. 2. Distribution of the PGE receptor subtype mRNAs in various mouse tissues.

<略語>

BSA	bovine serum albumin
cAMP	adenosine 3',5'-cyclic monophosphate
cDNA	complementary DNA
COX	cyclooxygenase
CTP	cytidine triphosphate
dbcAMP	dibutyl cAMP
EDTA	ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ES cell	embryonic stem cell
FSH	follicle-stimulating hormone
hCG	human chorionic gonadotropin
IL	interleukin
LPS	lipopolysaccharide
mRNA	messenger RNA
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
OVLT	organum vasculosum lamina terminalis
PBS	phosphate buffered saline
PMSG	pregnant mare serum gonadotropin
PG	prostaglandin
RNase	ribonuclease
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	standard saline citrate
TNF	tumor necrosis factor

第一章

プロスタグランジン E 受容体欠損マウスを用いた

生理機能の解析に関する研究

要約

PGE 受容体欠損マウスの作製

マウス 129/Sv の genome DNA ライブラリーより 各 PGE 受容体遺伝子を単離し、遺伝子構造のマッピングを行った。その結果、主要なコーディング領域を含むエキソンは EP1、EP4 受容体については第 2 エキソン、EP2、EP3 受容体については第 1 エキソンであることが判明した。そこで、常法により、これらの領域にネオマイシン耐性遺伝子を置換しあるいは挿入し、ターゲティングベクターを作製した。ターゲティングベクターを ES 細胞に導入し、キメラマウスを産生させた。次いで、キメラマウス同士を交配させ、F1 ヘテロマウス、さらに F2 マウス（野生型・ヘテロ変異体・ホモ変異体）を得た。EP-1, -2, -3、各サブタイプ受容体ヘテロ欠損体のかけ合わせにおいて、離乳した F2 マウスの野生型・ヘテロ体・ホモ体の存在比はメンデル法則 (1:2:1) に従っていたが、EP4 受容体欠損マウスの場合は野生型に対しホモ体は約 3% しか存在せず、発生・生育の過程で EP4 受容体が重要な働きをしていることが示唆された。

PGE 受容体欠損マウスの表現型についての解析

EP4 受容体ホモ欠損マウスは出生後の成育に重篤な障害のあることがわかった。EP4 受容体ヘテロ欠損マウスの雌雄をかけ合わせ、胎児の出生、出生後の成育などを分析した。その結果、胎生後期においては、EP4 ホモ変異体の数は野生型と同じであるが、生後 3 日目においては ホモ変異体の新生児マウスの 95% 以上が死亡した。そこで、ホモ変異体の死亡に至るまでの病理観察を行った。その結果、外見上はホモ変異体新生児

は生後すぐには野生型と異なる外見を認めないが、生後 24 時間以内に衰弱が始まり死亡に至ることを見出した。致死したホモ変異体の個体は肺異常が認められ、組織学的観察により、肺泡毛細血管のうっ血が認められた。ところで、胎児期には未熟な肺を保護するために肺動脈と大動脈をバイパスし、肺への血圧負荷を減じる血管である動脈管が存在する。そこで、この動脈管に着目し、まず、EP4 受容体の発現を解析したところ動脈管の平滑筋に大量の mRNA の発現を確認した。すでに、薬理学的な研究から、PGE₂ がウサギ動脈管の弛緩を cAMP 上昇を介して起こすことが報告されている。そこで、EP4 ホモ変異体の生後における動脈管の様子を観察したところ、野生型では生後呼吸を開始すると共に動脈管が収縮し始め、約 6 時間で完全に閉鎖するが、ホモ変異体では生後 24 時間から致死までの経過において動脈管の閉鎖が認められず、動脈管の閉鎖不全のあることを見出した。一方、少数の例ではあるが、生存する EP4 ホモ変異体が存在するが、このマウスの動脈管は完全ではないものの閉鎖していることを認めた。これらのことから、大部分の EP4 受容体欠損マウスの死亡原因は動脈管の異常に伴う閉鎖不全によることが示唆された。

一方、EP-1,-2,-3 各受容体欠損マウスの表現型について解析し、EP3 受容体ホモ変異体マウスは発熱機構に、また EP2 受容体ホモ変異体マウスは雌性生殖能に、それぞれ障害のあることが明らかになった。すなわち、EP3 ホモ変異体は PGE₂ による発熱を起こさず、さらに内因性発熱物質である IL-1 β や外因性発熱物質である LPS に対する発熱反応も起こさないことが判明した。また雌の EP2 ホモ変異体は出生率の低下という表現型を示し、これは卵巣内の卵丘細胞の機能に異常が存在することで排卵・受精の過程に障害がおきていることが示唆された。

実験結果

(1) PGE 受容体欠損マウスの作製

マウス 129/Sv の genome DNA ライブラリーより 各 PGE 受容体遺伝子を単離し、遺伝子構造のマッピングを行った。これらの解析から主要なコーディング領域を含むエキソンは EP1, EP4 については第 2 エキソン、EP2, EP3 については第 1 エキソンであることが判明した。ターゲティングベクターはこれらの領域にネオマイシン耐性遺伝子を置換 (EP2、EP3、EP4) もしくは挿入 (EP1) することとし、genome DNA との相同領域外にもう 1 つのマーカー遺伝子である単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ遺伝子を導入することとした (Fig. 3)。常法に従い、ターゲティングベクターを 129/Ola 由来の ES 細胞にエレクトロポレーション法により導入し、相同組み換え体のクローン選別を行った。得られたクローンをマウスの胚盤胞にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製した。キメラマウスを雌の野生型マウス (C57BL/6) と交配させることにより (129/Ola) X (C57BL/6) を遺伝的 background に持つ F1 ヘテロマウス、さらにそれら F1 マウス同士をかけ合わせ F2 マウス (野生型、ヘテロ変異体、ホモ変異体) を得た。相同組換えを起こした ES 細胞の選択、ヘテロ変異体、ホモ変異体の遺伝子型の確認は genome DNA の Southern 解析により行った (Fig. 4)。また、実際に受容体が欠損していることを確認するために、Northern 解析を行った (Fig. 5)。

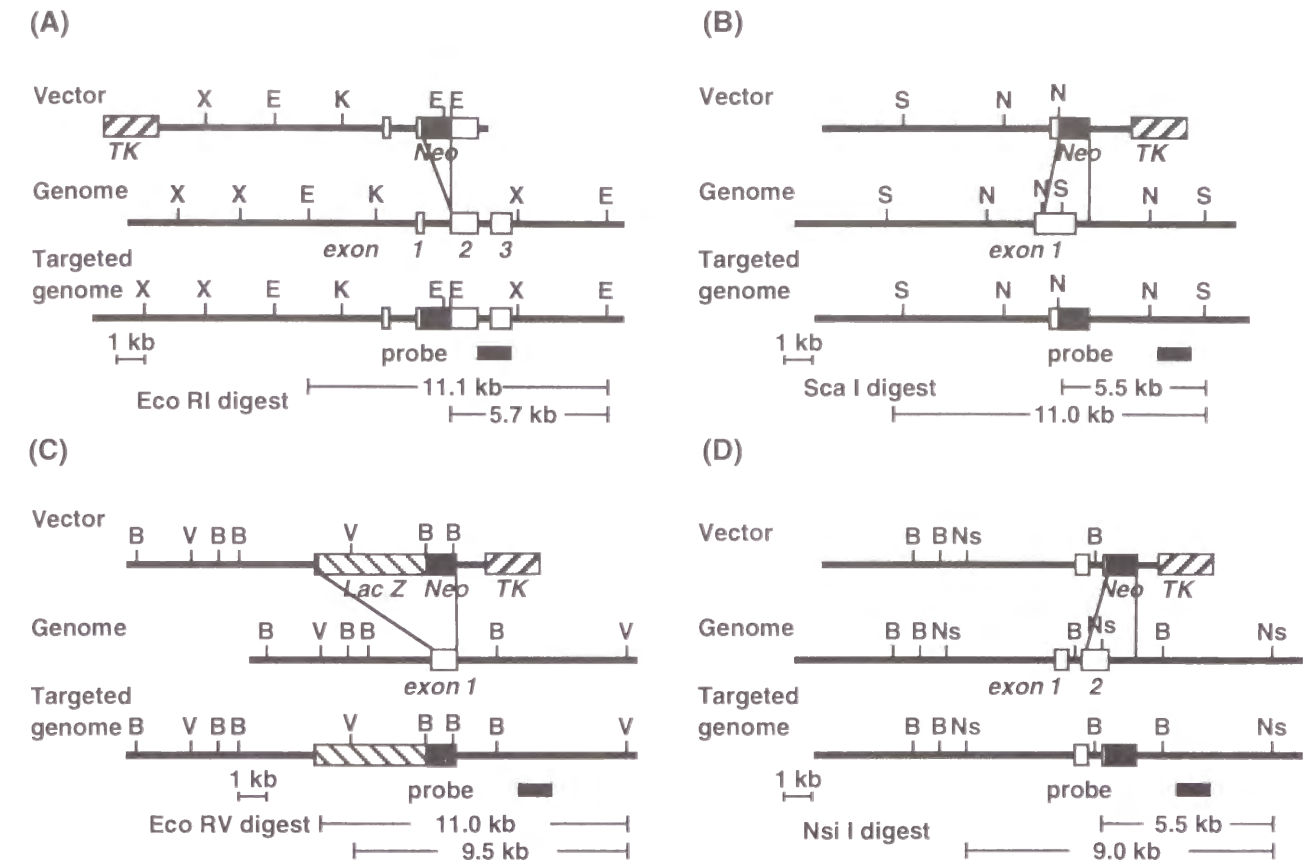


Fig. 3. The targeting vectors, organization of the genes, and structures of the targeted genomes are shown for the EP1 (A), EP2 (B), EP3 (C), EP4 (D) receptors. Restriction sites are indicated: X, Xba I; E, Eco RI; K, Kpn I; B, Bam HI; V, Eco RI; S, Sca I; N, Nco I; Ns, Nsi I. Probes used in Southern are indicated, with the sizes of hybridizing fragments shown below.

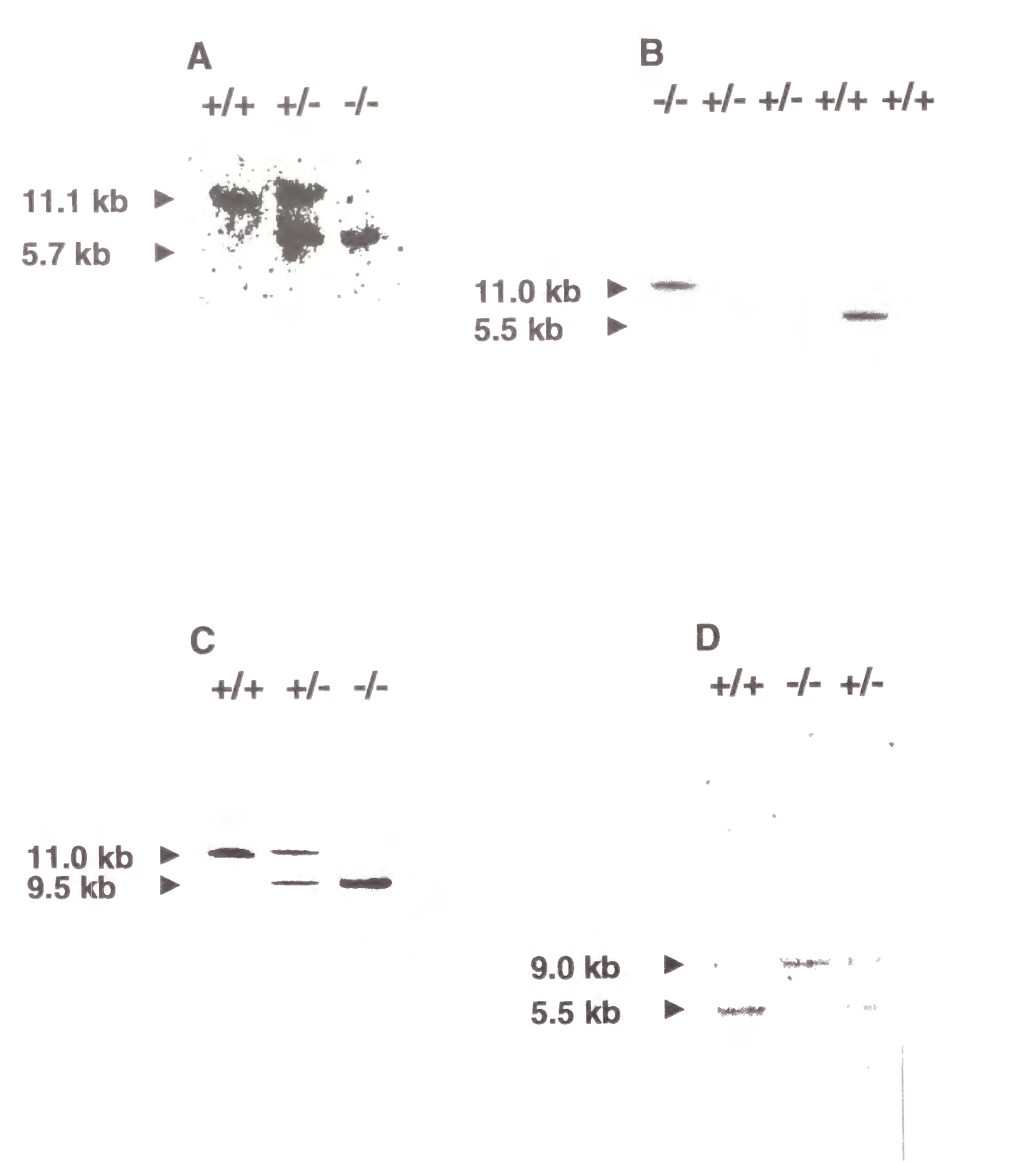


Fig. 4. Southern blot analysis of genomic DNA from EP1 (A), EP2 (B), EP3 (C), EP4 (D) receptor mutants. Genomic DNA digested with Eco RI in A, with Sca I in B, with Eco RV in C, with Nsi I in D were hybridized with the respective external probe shown in Fig. 3. +/+, wild type; +/-, heterozygote; -/-, homozygote.

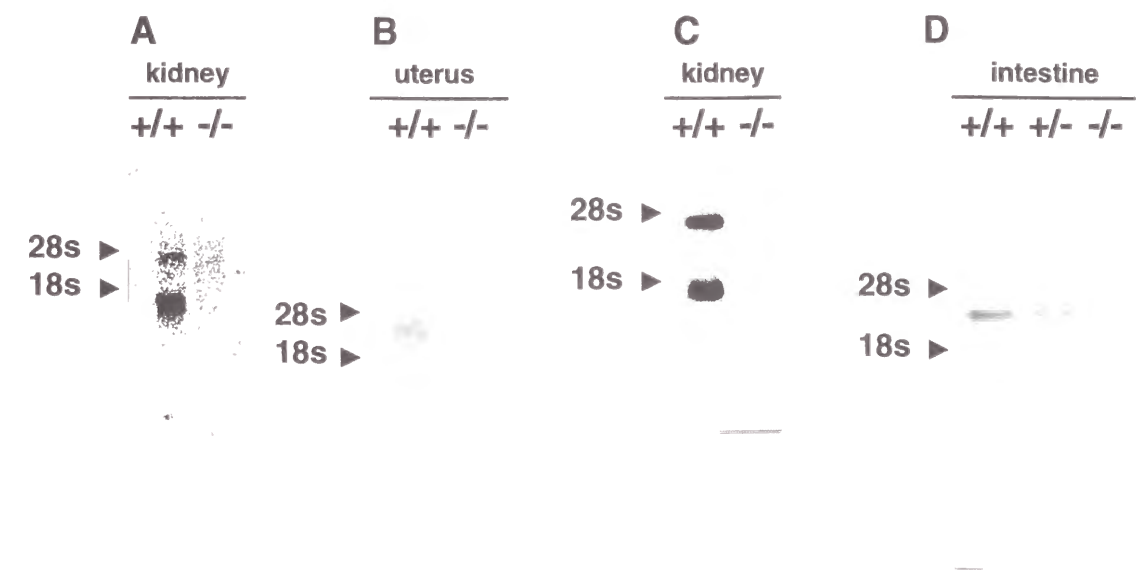


Fig. 5. Northern blot analysis. Total RNAs were isolated from kidney of the EP1 (A) and EP3 (C) from (+/+) and (-/-) mice, from uterus on day 5 of pregnancy of the EP2 (B) from (+/+) and (-/-) mice, and from intestine of newborn EP4 (D) from (+/+) and (-/-) mice, and they were used for hybridization with each specific probe. +/+, wild type; +/-, heterozygote; -/-, homozygote.

(2) EP4 受容体欠損マウスの死因についての解析

EP-1, -2, -3 受容体ヘテロ変異体のかけ合わせにおいて、出生した F2 マウスの野生型・ヘテロ変異体・ホモ変異体の存在比はメンデルの法則 (1:2:1) に従っており、また、外観上顕著な異常は観察されなかった。しかしながら、離乳した F2 マウスの EP4 ホモ変異体は野生型に対し約 3% 程度しか存在せず、EP4 ホモ変異体の出生以降の生育過程で致命的な障害のあることが示唆された。そこで、このマウスにおける死因の解析を試みた。まず、胎生中期・後期において母体内に生存している仔の遺伝子型を解析したところ、EP4 ホモ変異体は野生型と同程度存在していた。しかしながら、生後 3 日目において調べたところ、すでにその大部分が死亡していることが確かめられた。(Table 2)。そこで、周産期において死亡に至るまでの経過を詳細に観察したところ、ホモ変異体は生後すぐに呼吸を開始し、外見上野生型と異なるところは見られず、また、ほ乳行動も認められた。しかし、生後 24 時間以内に衰弱が始まり皮膚が蒼白となり、大多数は生後 72 時間以内に死亡に至ることが判明した。衰弱している EP4 ホモ変異体の組織解析を行ったところ、肺胞構造が乱れており毛細血管のうっ血がみられ、循環障害が起きていることが示唆された (Fig. 6)。また、左心室、肺動脈の拡張も観察された。これらのことは肺循環系のうっ血と体循環系の循環不全が起きていることを示している。胎児循環系における EP4 受容体 mRNA の発現解析を行ったところ、動脈管と呼ばれる胎児期特異的に機能する血管平滑筋に大量に発現していることが明らかになった (Fig. 7)。そこで、生後における動脈管の様子を凍結切片作成法により観察したところ、野生型では生後呼吸を開始すると共に動脈管が収縮し始め、約 5 時間で完全に閉鎖に至ったが、EP4 ホモ変異体では生後 24 時間が経過しても動脈管の閉鎖が認められず、死亡するまで閉鎖不全を起こしていることが判明した (Fig. 8)。生後 6 時間における野生型と EP4 ホモ変異体の動脈管を更に観察したところ、野生型の動脈管平滑筋は肥厚が認められ、内皮細胞が血管内部を閉鎖していたのに対し、ホモ変異体の動脈管ではまったく平滑筋の収縮が起っていないことが判明した (Fig. 9)。一方、少数であるが生存した EP4 ホモ変異体の動脈管は、完全ではないものの閉鎖の起きていることが見られた (Fig. 10)。死亡した EP4 ホ

モ変異体ではすべてが動脈管の閉鎖不全を起こしていること、また生存した少数のホモ変異体は不完全であるものの動脈管収縮が観察されたことより、大部分の EP4 受容体欠損マウスの死亡原因は動脈管の異常に伴う閉鎖不全によることが示唆された。

EP4 受容体ホモ変異体においてこのように表現型のばらつきが見られた理由の 1 つとして、それぞれのマウスで遺伝的背景が異なることが考えられる。戻し交配により遺伝的背景を C57BL/6 に近づけた EP4 ヘテロ変異体を用いて仔の生存率を確認したところ、現在までに生存が認められたものはない (Table 2)。また、少数の生存した EP4 ホモ変異体同士をかけ合わせていったところ、その生存率は 4 回かけ合わせた時点で 35% にまで上昇した (Table 3)。すなわち、生存可能であった EP4 ホモ変異体は各々のマウス系統で変化するような因子の組み合わせによって動脈管の部分的な収縮が起こったものと考えられる。このようにして生存した EP4 ホモ変異体は外観上の顕著な異常は観察されず 1 年以上の生存が可能であり、生殖も可能であった。

(3) EP4 受容体欠損マウスの動脈管の性質についての解析

EP4 受容体は cAMP 上昇系に共役しており、またウサギ動脈管を用いた薬理実験からは PGE₂ が cAMP 上昇を介して動脈管を弛緩させる働きを持つことが示唆されている (8)。また、筆者の研究により、マウス動脈管に EP4 受容体 mRNA が大量に発現していることが見いだされた。従って、EP4 受容体が欠損した場合、動脈管の収縮が仮説されたが、実際にあらわれた表現型は動脈管の収縮不全であった。このことは、EP4 受容体欠損マウスの動脈管は、単に EP4 受容体の弛緩機能のみの欠損ではなく、動脈管の収縮・弛緩に関与する他の因子の働きに変化が起きている可能性を示唆していると考えられる。そこで、EP4 ホモ変異体の動脈管の性質がどのように変化しているかについて検討を行った。まず、動脈管における EP4 受容体以外の 7 種類のプロスタノイド受容体 mRNA の発現及び受容体の内因性リガンドを合成する cyclooxygenase (COX)-1,-2 の発現に変化がないかについて解析した。その結果、野生型マウスの動脈管では、EP1, TP 各受容体 mRNA は中程度に、EP3, DP 各受容体 mRNA はかすかに、一方、cyclooxygenase

(COX)-1,-2 については COX-1 が中程度に発現していることがわかった。しかし、これらの発現は、EP4 受容体の発現が動脈管に局在して発現していることは異なり、動脈管とともに隣接する大動脈にも同様の発現が認められた (Table 4)。さらに、このような発現パターンは EP4 ホモ変異体の動脈管においても観察された (data not shown)。従って、EP4 受容体欠損マウスの動脈管において EP 4 受容体以外のプロスタノイド受容体が補償的に機能しているとは考えにくいと結論した。また、ラット胎仔の動脈管はインドメタシンにより収縮を起こすこと (9) が知られており、これは弛緩に関与する内在性のプロスタノイドが減少するためと考えられている。そこで、EP4 ホモ変異体はインドメタシンに対する感受性がどの程度変化しているかについて検討した。妊娠最終日の母胎に 5 mg/kg のインドメタシンを腹腔内に投与し 4 時間後に帝王切開して仔を取り出し、動脈管を観察したところ、野生型では動脈管の収縮が観察され動脈管壁が肥厚していたのに対し、EP4 ホモ変異体では収縮は認められなかった (Fig. 11)。すなわち、EP4 受容体欠損マウスではプロスタノイドが減少しても動脈管は弛緩し続けることを示しており、この実験結果も、プロスタノイド以外の因子が動脈管の持続的な弛緩に関与するとする著者の仮説の妥当性を支持する。

Table 2. Genotypes of progenies of heterozygote intercrosses.

Genetic background	Time of analysis	Genotype of progenies from (+/-) X (+/-)		
		+/+	+/-	-/-
(129/Ola) x (C57BL/6)	E14.5 fetuses	16	41	20
	E19.5 fetuses	40	67	37
	3-day-old neonates	181	309	5

(C57BL/6)	3-day-old neonates	50	84	0

The genotypes and numbers of living mice and fetuses are shown.

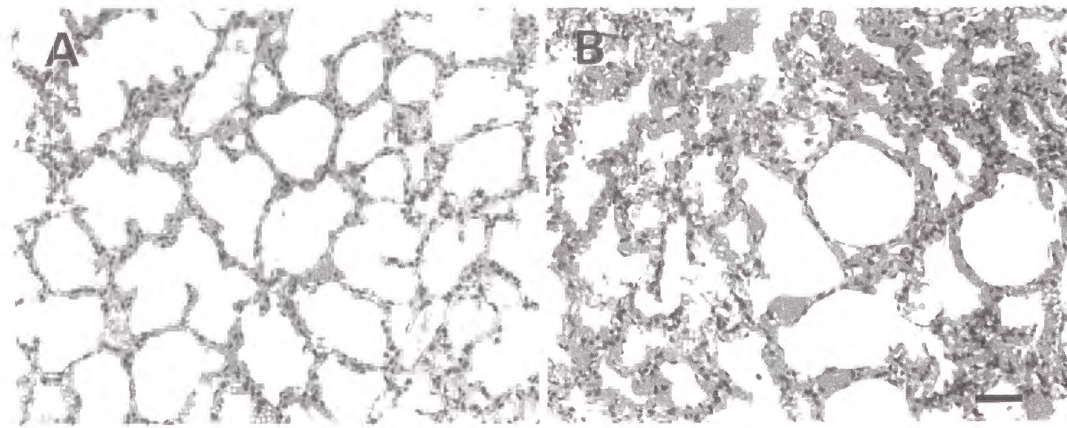


Fig. 6. Histological analysis of lung from a wild-type and a EP4 (-/-) mouse sacrificed at 30 h after birth. Marked congestion of the pulmonary capillaries and disorganized alveolar structures are seen in the lung of a EP4 (-/-) mouse. Bar, 50 μ m.

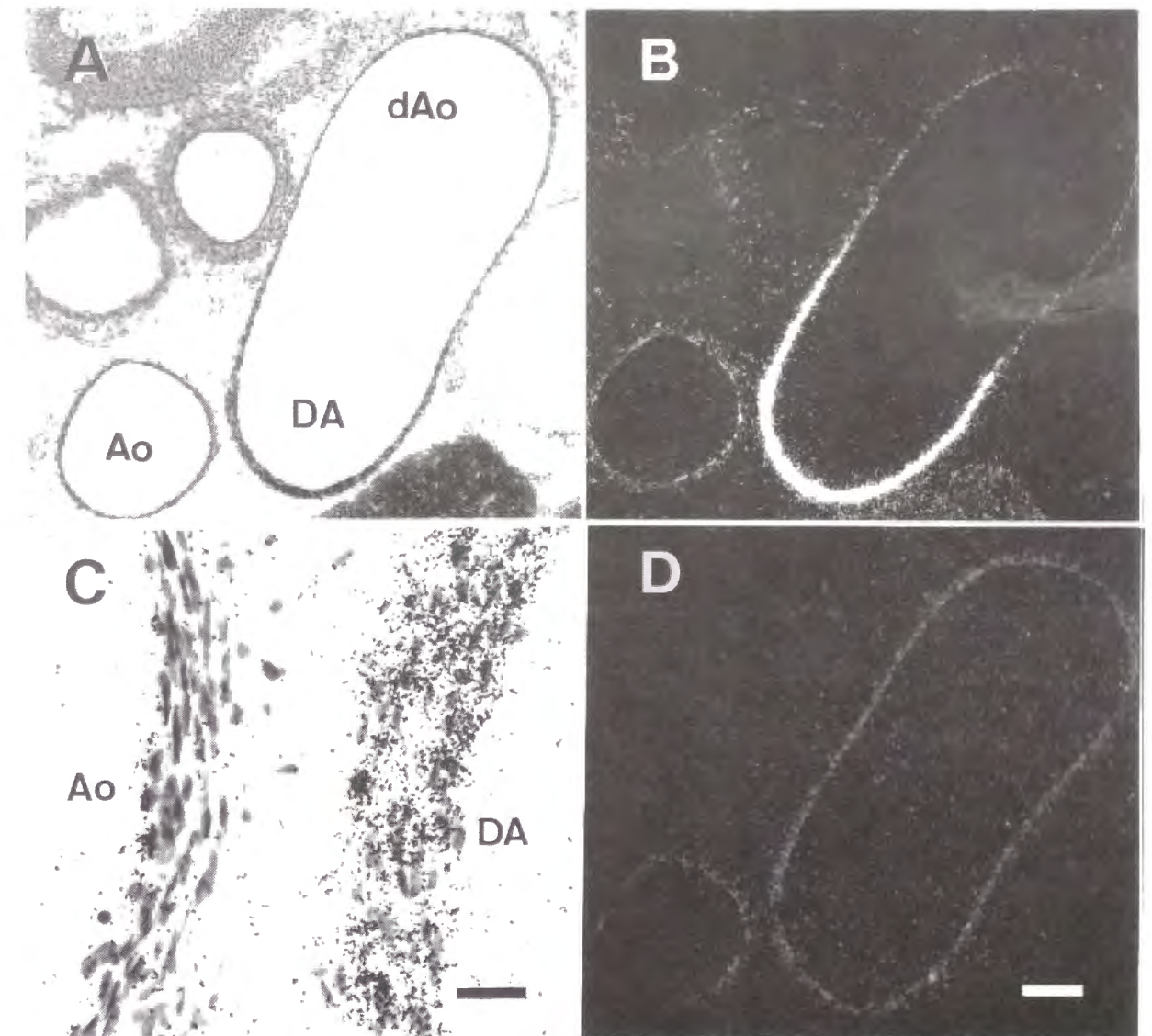


Fig. 7. *In situ* hybridization of the EP4 transcripts. Photomicrographs are thoracic sections of a wild type E18.5 fetus. These sections were hybridized with a 35 S-labeled antisense RNA probe for the EP4 receptor in the absence (A, B and C) or presence (D) of an excess amount of unlabeled probe (A and C, bright-field; B and D, dark-field). Strong signals are observed in the smooth muscle layer of the ductus arteriosus. Ao, aorta; dAo, descending aorta; DA, ductus arteriosus. Bars, 200 μ m (D) and 25 μ m (C). The magnifications of micrographs A, B and D are the same.

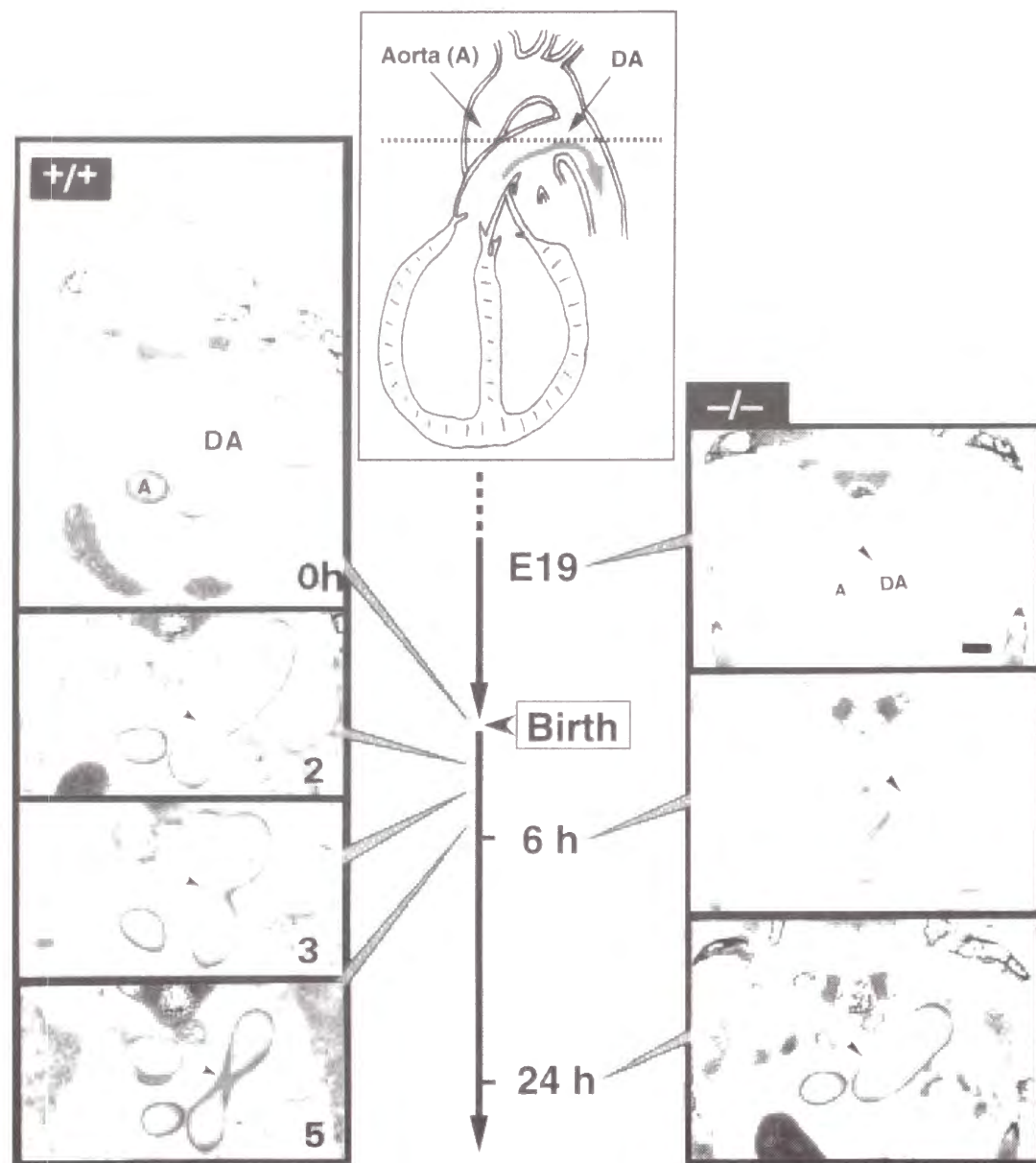


Fig. 8. Morphological changes of ductus arteriosus after birth of wild type mice (left) and EP4 (-/-) mice (right). Middle; the model of fetal circulation. Ductus arteriosus are shown by arrowhead. A, aorta; DA, ductus arteriosus.

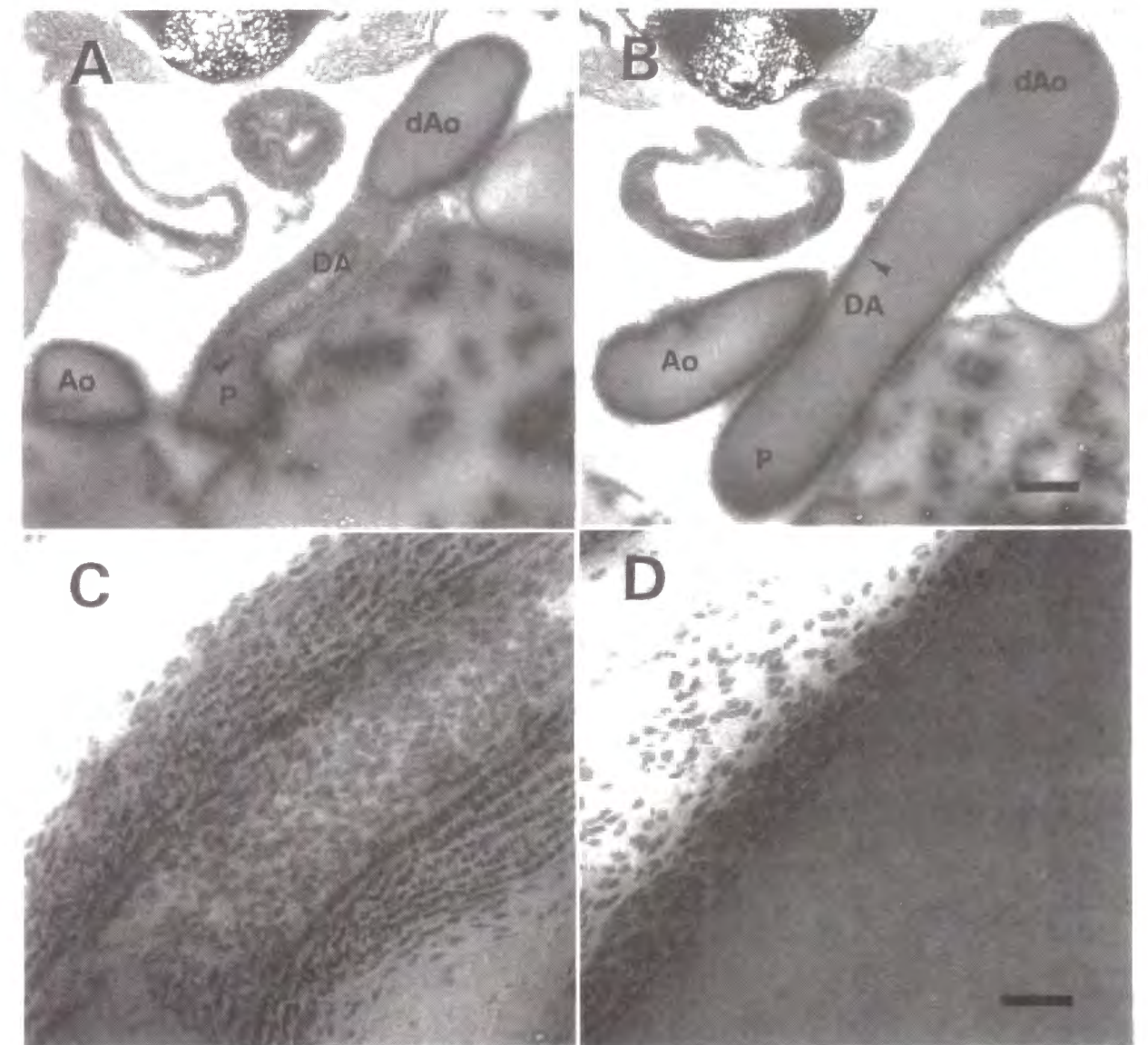


Fig. 9. Patency of the ductus arteriosus in EP4 (-/-) neonates. Thoracic sections of a wild type (A, C) and a homozygous (B, D) neonate sacrificed at 6 h after birth are shown. Bottom panels are magnifications of the arrowhead on each top panel. In the wild type, the ductus arteriosus is completely closed and its wall is thickened. On the other hand, in the homozygous neonate, the ductus is open and its wall is thin. Ao, aorta; dAo, descending aorta; P, pulmonary artery; DA, ductus arteriosus. Bar, 200 μ m (B) and 25 μ m (D).

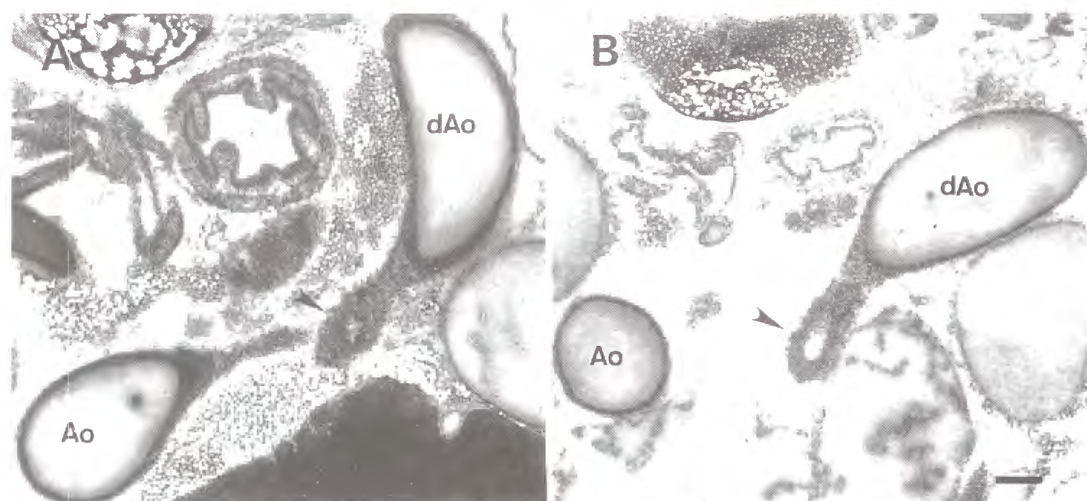


Fig. 10. The ductus arteriosus in the survived EP4 (-/-) neonate. Thoracic sections of a wild type (A) and a survived homozygous (B) neonate sacrificed at 3 days after birth are shown. Eight surviving homozygous mice at various ages were examined, and representatives are shown. The ductus arteriosus (arrowhead) in the survived homozygous animals are almost closed. Ao, aorta; dAo, descending aorta. Bar, 200 μ m.

Table 3. Survival ratio of EP4-deficient mice having (129/Ola) x (C57BL/6) genetic background.

	Parental genotype		Survival ratio*
	♂	♀	
F2	(+/-) X (+/-)		2.8 %
F3	(-/-) X (+/-)		4.0 %
F4	(-/-) X (-/-)		4.6 %
F5	(-/-) X (-/-)		29.6 %
F6	(-/-) X (-/-)		34.5 %

* Compared with +/+ littermate (F2), +/- littermate (F3 & F4) and offspring of (+/+) X (+/+) mate (F5 & F6)

Table 4. The expression of prostanoid receptors and cyclo-oxygenases in embryonic ductus arteriosus and aorta.

	Relative grain densities in <i>in situ</i> hybridization	
	Ductus Arteriosus	Aorta
EP1	++	++
EP2	-	-
EP3	+	+
EP4	++++	+
IP	-	-
TP	++	++
FP	-	-
DP	+	+
<hr/>		
COX-1	++	++
COX-2	-	-

Relative grain densities: +++++, very high; ++, moderate; +, low; -, background level.

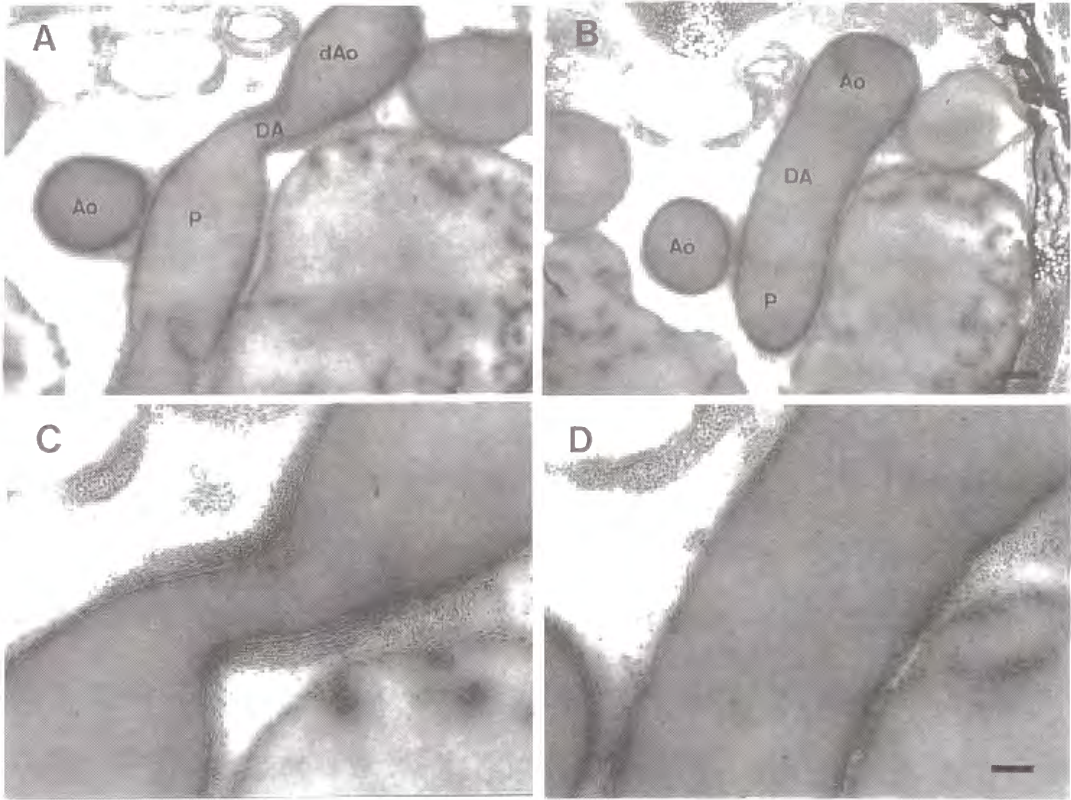


Fig. 11. Effect of indomethacin on the fetal ductus arteriosus. The ductus arteriosus of a wild type (A, C) and a EP4 (-/-) (B, D) fetus are shown after four hours exposure to indomethacin. Bottom panels are magnified on upper panels. Indomethacin (5 mg/kg) was administered to E19.0 pregnant EP4 (+/-) mice intraperitoneally. The ductus arteriosus of the EP4 (-/-) embryo remains open, while constriction of the vessel has occurred in the wild type littermate.

(4) EP3 受容体欠損マウスの発熱に関する解析

EP3 受容体欠損マウスは発生・生育には顕著な異常は認められず、1年以上の期間にわたって生存可能であり、その間の生殖機能に異常は認められなかった。しかし、EP3 ホモ変異体は発熱機能において異常のあることが判明した。

発熱反応は病態の最も基本的な全身反応であり、菌体成分である lipopolysaccharide (LPS) や非感染性の炎症性物質などの外来性の発熱物質によって引き起こされる。発熱はこのような外来性の刺激により体内で IL-1 β を始めとする内因性の発熱物質が産生され、それが脳に作用することで起きる (10)。アスピリン・インドメタシン等の非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) が解熱作用をもつことから、プロスタノイドが発熱反応に重要な役割を果たしているものと考えられている。実際に、脳内に PGE₂ 投与すると発熱反応がおこることから、PGE₂ が脳内での発熱のメディエーターであると考えられているが (11)、それについては異論も多くあり (12-14)、またどの PGE 受容体を介するかについても不明であった。そこで、各 PGE 受容体サブタイプ欠損マウスを用いて、発熱における PGE₂ の役割と受容体サブタイプの同定を目的に研究を行った。

まず、PGE₂ による発熱がどの受容体を介しているかを調べるために、PGE₂ を 1 nM 脳室内に投与した時の発熱反応 (15) について検討を行った。野生型においては投与後約 30 分をピークとする約 2°C の一過性の発熱が認められた (Fig. 12A)。4 種類の PGE 受容体サブタイプ欠損マウスにおいて同様の発熱実験を行ったところ、EP3 受容体欠損マウスのみが PGE₂ の投与に対し発熱応答を起こさなかった (Fig. 12B)。尚、EP4 受容体欠損マウスは新生児死亡を起こすためその成体数は限りがあるため、以下の検討では用いていない。次に、内因性発熱物質である IL-1 β によって誘因される発熱 (10) について、その PGE₂ の関与を検討した。野生型に IL-1 β を静脈内投与を行ったところ、約 25 分をピークとする一過性の発熱が認められた。EP1, EP2 受容体各欠損マウスでは野生型と同様に発熱を引き起こしたが、EP3 ホモ欠損体では発熱は起きなかった (Fig. 13A)。IL-1 β は脳室内投与によっても発熱を引き起こすが、その発熱経路は静脈内投与時とは異なるものと考えられている。そこで、IL-1 β を脳室内投与した時の発熱反応について検討を行っ

た。野生型マウスにおいて IL-1 β を脳室内投与したところ、静脈内投与時と比較して発熱の開始は遅く、またその発熱は持続的であった (Fig. 13B)。EP1, EP2 各ホモ欠損体では野生型マウスと同様に発熱を引き起こしたが、EP3 ホモ欠損体では静脈内投与時と同様に発熱は起きなかった (Fig. 13C)。LPS などの外因性発熱物質による発熱は IL-1 β 以外の内因性発熱物質による関与もあることが知られている (16, 17)。実際、LPS は IL-6, TNF- α , IL-8 などの内因性発熱物質の誘導を行う。そこで、EP3 受容体が LPS による発熱誘導にどの程度の関与をするかについて検討した。まず、EP3 ホモ欠損体に由来する腹腔マクロファージの IL-1 β , IL-6 産生能について検討を行ったところ、野生型とほぼ同程度の産生が見られた (data not shown)。そこで LPS を 10 mg/kg 静脈内注射したところ、野生型、EP1 ホモ変異体では約 20 分をピークとする約 1°C の一過性の発熱が認められたが、EP3 ホモ欠損体ではやはり発熱が認められなかった (Fig. 14)。以上の結果より、PGE₂ による発熱は EP3 受容体を介していること、また、外因性発熱物質 LPS による発熱にも PGE₂ が脳内のメディエーターとして必須の役割を果たしていることを明らかにすることができた。

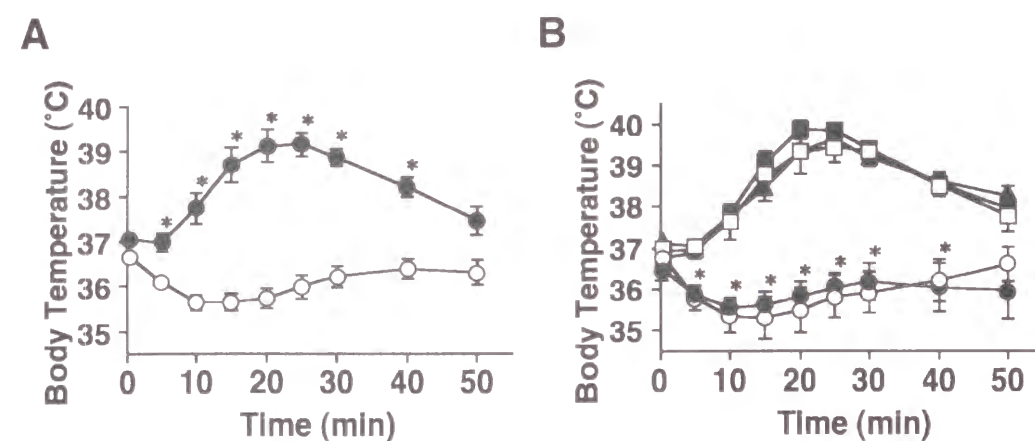


Fig. 12. Effects of PGE₂ on body temperature in wild type and PGE receptor deficient mice. A, PGE₂-induced fever in wild type mice. Animals were injected i.c.v. with either PGE₂ (filled circles, n=9) or vehicle (open circles, n=9), and rectal temperature was monitored. Asterisk indicates P<0.01 versus vehicle control. B, Selective loss of PGE₂-induced febrile response in EP3 (-/-) mice. PGE₂ was injected i.c.v. into EP1 (-/-) (filled squares, n=5), EP2 (-/-) (open squares, n=5), EP3 (-/-) (filled circles, n=5) and EP4 (-/-) (filled triangles, n=5) mice. Vehicle was injected i.c.v. into EP3 (-/-) mice (open circles, n=9). Asterisk indicates P<0.01 for EP3 (-/-) mice versus wild type mice injected with PGE₂.

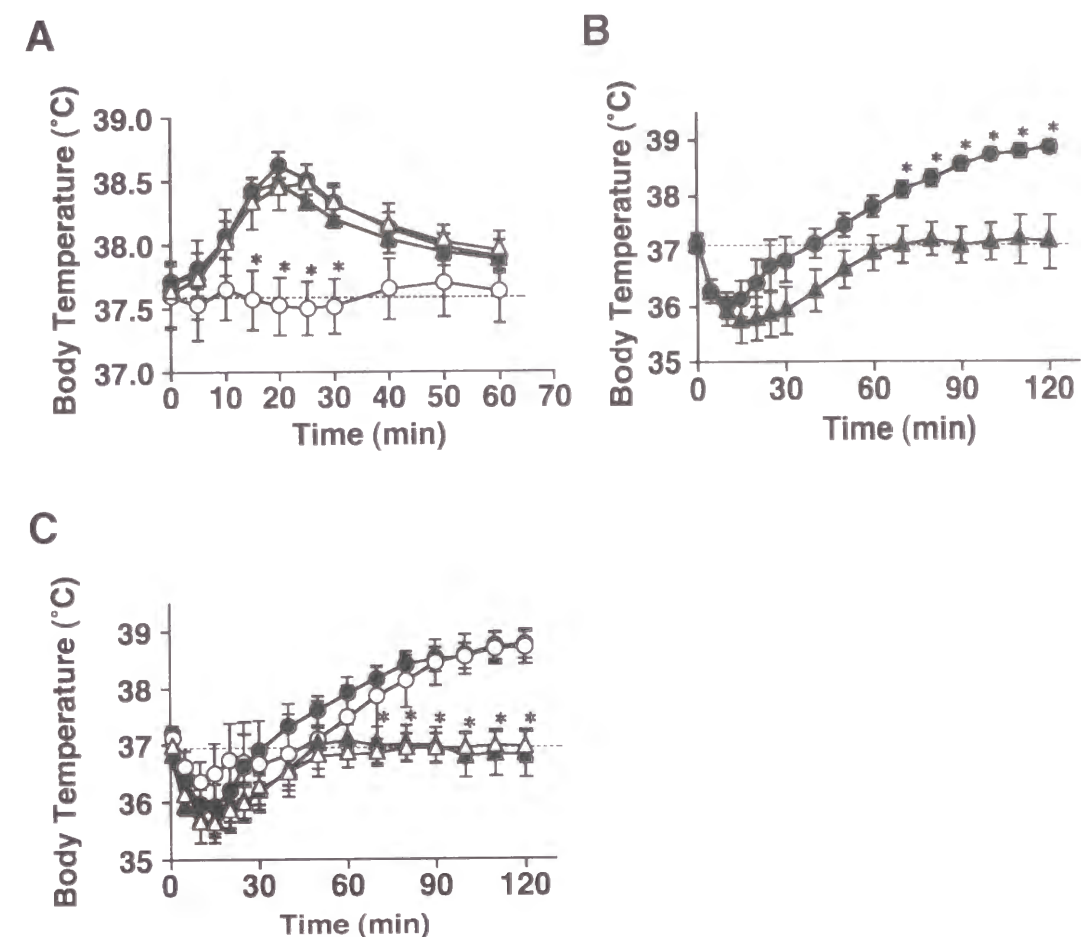


Fig. 13. Loss of the IL-1 β -induced febrile response in EP3 (-/-) mice. A, IL-1 β (100 ng) was injected i.v. into wild type (filled circles, n=9), EP1 (-/-) (filled triangles, n=6), EP2 (-/-) (open triangles, n=6) and EP3 (-/-) mice (open circles, n=6). Asterisk indicates P<0.01 EP3 (-/-) mice versus wild type mice. B, Either IL-1 β (10 ng) (filled circles, n=14) or vehicle (filled triangles, n=9) was injected i.c.v. into wild type mice. Asterisk indicates P<0.01 versus vehicle control. C, IL-1 β was injected i.c.v. into EP1 (-/-) (filled circles, n=5), EP2 (-/-) (open circles, n=6), and EP3 (-/-) mice (filled triangles, n=8); other EP3 (-/-) mice were injected with vehicle (open triangles, n=9). Asterisk indicates P<0.01 EP3 (-/-) mice versus wild type mice injected with IL-1 β i.c.v. Dotted lines indicate the body temperature before injection.

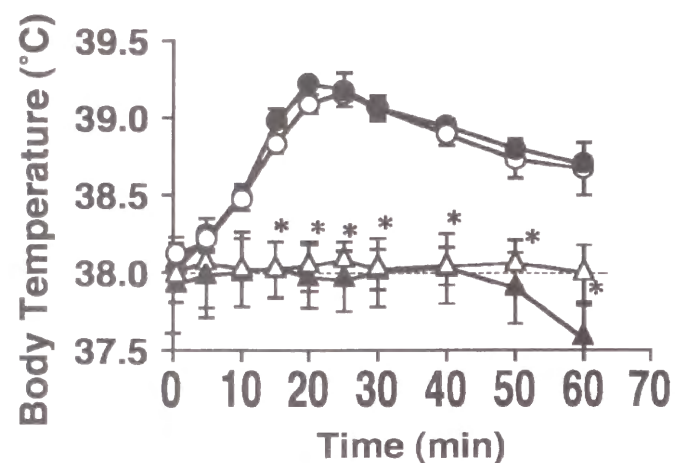


Fig. 14. Responses to LPS in mice lacking the EP1 or EP3 receptor. LPS or vehicle was injected i.v. open circles, wild type mice with LPS (n=7); filled circles, EP1 (-/-) mice with LPS (n=5); filled triangles, EP3 (-/-) mice with LPS (n=4); open triangles, wild type mice with vehicle (n=5). Asterisk indicates $P < 0.01$ for EP3 (-/-) mice versus wild type mice injected with LPS.

(5) EP2 受容体欠損マウスの雌性生殖障害についての解析

EP2 受容体欠損マウスは発生・生育の過程において顕著な異常は確認されなかった。雄の EP2 ホモ欠損体は生殖能に異常は認められなかった。雌の EP2 ホモ欠損体はその性周期は正常であり妊娠・出産をすることができるが、一腹あたりの出産数が減少しており、1回の妊娠において平均1匹程度しか出生しなかった。このような同腹仔の減少は妊娠19日目においても観察された。野生型は平均7.1匹を出生するのに対し、EP2受容体欠損マウスでは1.5匹であった (Fig. 15A)。このような出生数の減少は妊娠7日目の胎児数において確認されることから、それ以前の過程である排卵・受精・受精卵の着床・子宮内膜の脱落膜化に依存した反応と考えられた。

これまでの研究において、EP2 mRNA が着床期である妊娠5日目の子宮上皮細胞に強く発現していることが見いだされていた (18)。そこで、EP2 ホモ欠損体の着床能について検討した。実験は、偽妊娠マウスを作製し、その4日目の子宮に野生型のプラストシストを移植し、妊娠14日目に着床数を測定した。その結果、EP2 ホモ欠損体での着床数は野生型マウスでのそれと同程度であることから、EP2 ホモ欠損体の着床・脱落膜化は正常であると推定した (data not shown)。次に、自然排卵時における排卵数と受精率について解析を行った。排卵数についてはEP2 ホモ欠損体において若干の減少が見られた。これらの卵の受精率は野生型では55%であるのに対し、EP2 ホモ欠損体においては8.5%であった (Fig. 15B, C)。ゴナドトロピンを投与し、過排卵処理を行ったマウスについても排卵の軽微な減少と受精率の重度な減少が観察され、上記の異常は下垂体ホルモンの産生過程によるものではないことが示された。過排卵処理を行った時、EP2 ホモ欠損体の卵巣内に存在する排卵可能な卵胞数は野生型と同程度であったことから (wild type, 27.6 ± 2.6 ; EP2 $-/-$, 29.5 ± 3.0 ; means \pm SEM)、EP2 受容体欠損マウスの異常は卵胞の生育過程ではなく排卵とそれに続く受精の過程にあることが示唆された。

過排卵処理した卵巣で EP2 mRNA の発現を COX-2 mRNA の発現 (19, 20) と比較して検討したところ (Fig. 16)、妊馬血清ゴナドトロピン (pregnant mare serum gonadotropin; PMSG) 投与後48時間において EP2 mRNA は卵胞膜細胞に弱い発現が見られた。COX-2

mRNA は発現が見られなかった。ヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin; hCG) 処理後 4 時間において COX-2 mRNA は前排卵卵胞の顆粒膜細胞と卵丘細胞に大量に発現していた。hCG 処理後 8 時間で、顆粒膜細胞においては COX-2 mRNA の発現は減少していたが、卵丘細胞においては高いレベルが維持された。EP2 mRNA は hCG 処理後に卵丘細胞に誘導され、その発現は排卵直前の hCG 処理後 12 時間まで続いた。そこで、卵丘細胞に焦点をあて EP2 受容体欠損マウスの解析を行った。

卵丘細胞は卵の周りを取り囲む細胞であり、卵を保護すると共にその成熟にも関与する。排卵期と受精期において、卵丘細胞は expansion という現象をおこす (21)。expansion は卵丘細胞の間隙が広がっていく現象を指し、卵丘細胞からのヒアルロン酸マトリックスの分泌上昇を大きな特徴とする (22)。生体においてはゴナドトロピンの preovulatory surge によって引き起こされるが、in vitro においても cAMP アナログや卵胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone; FSH) あるいは PGE_2 によってもこの現象が模倣されることが知られている (23, 24)。EP2 ホモ欠損体からの卵丘細胞を用い in vitro による expansion を検討したところ、dbcAMP や FSH 添加による expansion は野生型由来の卵丘細胞のそれと違いはなかったが、 PGE_2 による expansion は起こらなかった (Fig. 17)。すなわち、 PGE_2 による expansion は EP2 受容体を介していること、また、EP2 受容体欠損マウスはゴナドトロピンに対する反応性には異常がないことがわかった。実際に、in vivo における卵・卵丘細胞複合体の形態を観察したところ、野生型マウス由来の卵丘細胞は卵から均一に膨潤しており卵と卵が適度の間隔をもって開いていたが、EP2 ホモ欠損体においては卵丘細胞の expansion は不完全でかつ部分的に凝集していた (Fig. 18)。すなわち、EP2 受容体欠損マウスでは expansion を含む卵丘細胞の機能に異常が存在することが推察された。卵丘細胞の異常が、EP2 受容体欠損マウスの受精率の低下に関与している可能性を調べるために in vitro における受精効率を測定した。卵・卵丘細胞複合体の状態では受精率を比較したところ、野生型マウスのそれと比較して EP2 ホモ欠損体の受精率の減少を確認した (Fig. 19A)。また、卵・卵丘細胞複合体と複合体から卵丘細胞をはずした状態の卵での受精率を比較検討したところ、野生型マウスの場合では、

受精率が大幅に減少したのに対し、EP2 受容体欠損マウスでは卵丘細胞の有無により受精率の変化はほとんど観察されなかった (Fig. 19B)。従って、卵丘細胞は卵の成熟に寄与し、受精率に影響を及ぼしており、これらの過程に EP2 受容体に関与していることが示唆された。

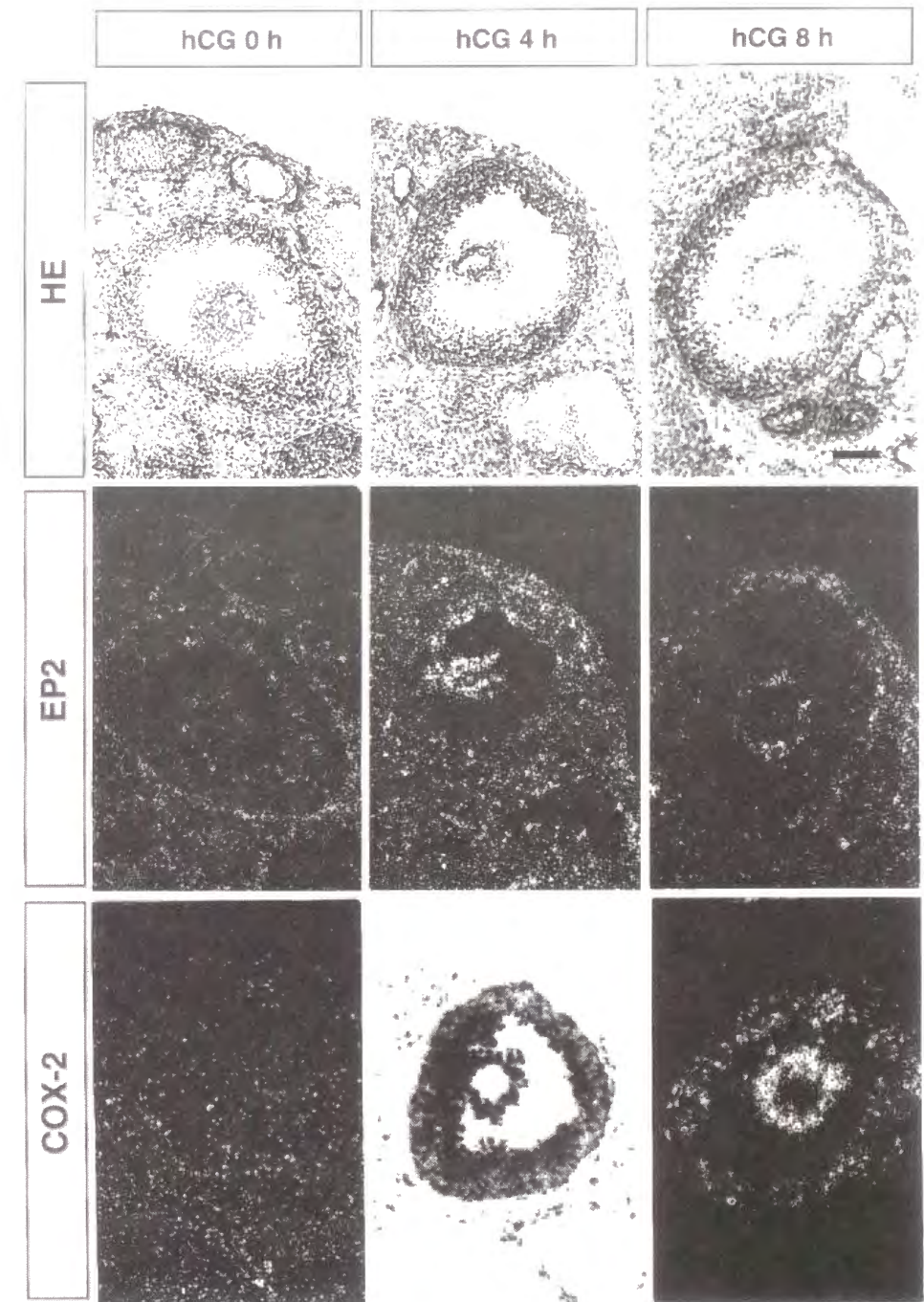
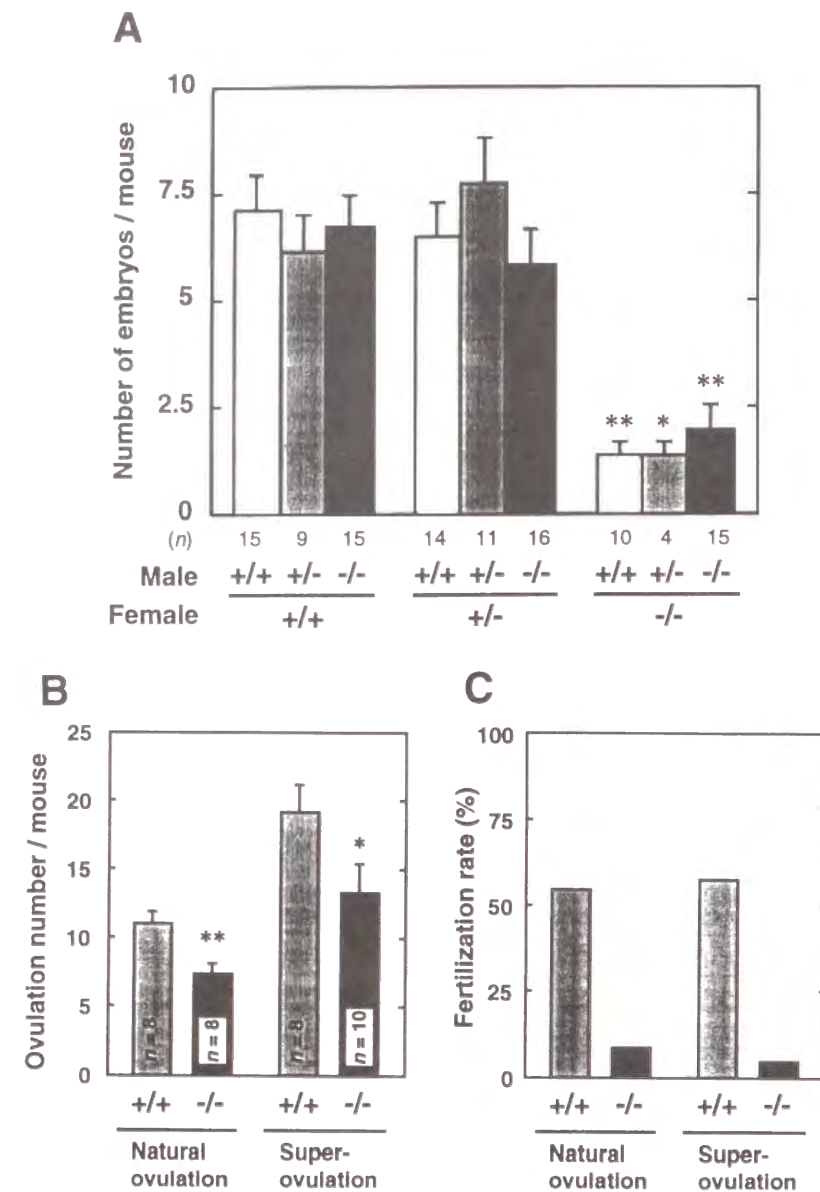


Fig. 15. Impaired ovulation and fertilization in EP2 (-/-) mice. (A) Decrease in litter size in EP2 (-/-) female mice. Female mice were mated with male in the indicated combination of genotypes, and their litter sizes were examined on day 19 of pregnancy. The results are shown as the mean \pm SEM. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ (vs. wild type females). (B and C) Ovulation and fertilization rates in natural and superovulation. Mature (8-week-old) or immature (5-week-old) superovulated mice were mated with wild type male mice. Eggs were recovered from their oviducts, and the eggs with pronuclei or in the two-cell stage were taken as fertilized. The number of ovulated eggs (B) and the fertilization rate (C) are expressed as the mean \pm SEM and as a percent of the sum of fertilized eggs vs. total ovulated eggs, respectively.

Fig. 16. Expression of EP2- and COX-2-mRNA in the developing follicle detected by *in situ* hybridization. The photomicrographs show hematoxylin-eosin-staining (top panels), signals for EP2-mRNA (middle panels), and signals for COX-2-mRNA (bottom panels). Wild type 4-week old females were primed with PMSG, and ovaries were isolated before hCG injection (left panels; hCG 0 h), 4 h after hCG injection (center panels; hCG 4 h), or 8 h after hCG injection (right panels; hCG 8 h). the photomicrographs showing hybridization signals were presented in a dark field-mannar except that of the COX-2 signals at 4 h post-hCG, in which extremely strong signals were seen in the bright field. Bar, 200 μ m.

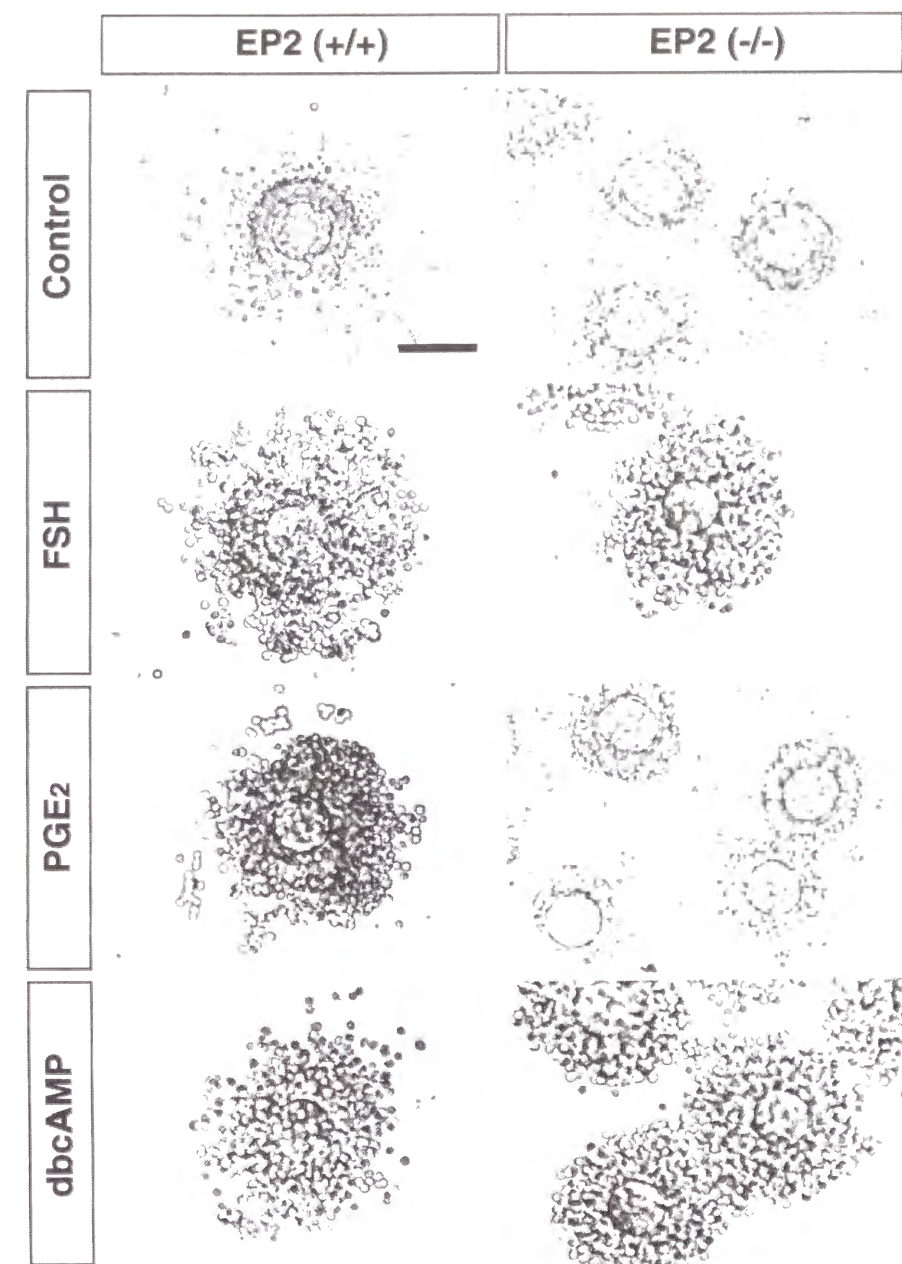


Fig. 17. In vitro expansion in immature cumuli oophori from EP2 (-/-) mice. Immature cumuli oophori were isolated from PMSG-treated wild type (left panels) and EP2 (-/-) mice (right panels). The isolated complexes were incubated with media only (Control), or media containing FSH (FSH), PGE₂ (PGE₂), or dibutyl cAMP (dbcAMP). The expanded complexes were recovered and processed onto slides (PGE₂ in wild type, and FSH and dbcAMP in both animals). Complexes that did not expand adhered to the dishes and were processed directly (PGE₂ on EP2 (-/-), and control in both animals). The surfaces of the complexes are indicated by arrowheads. Bar, 100 μ m.

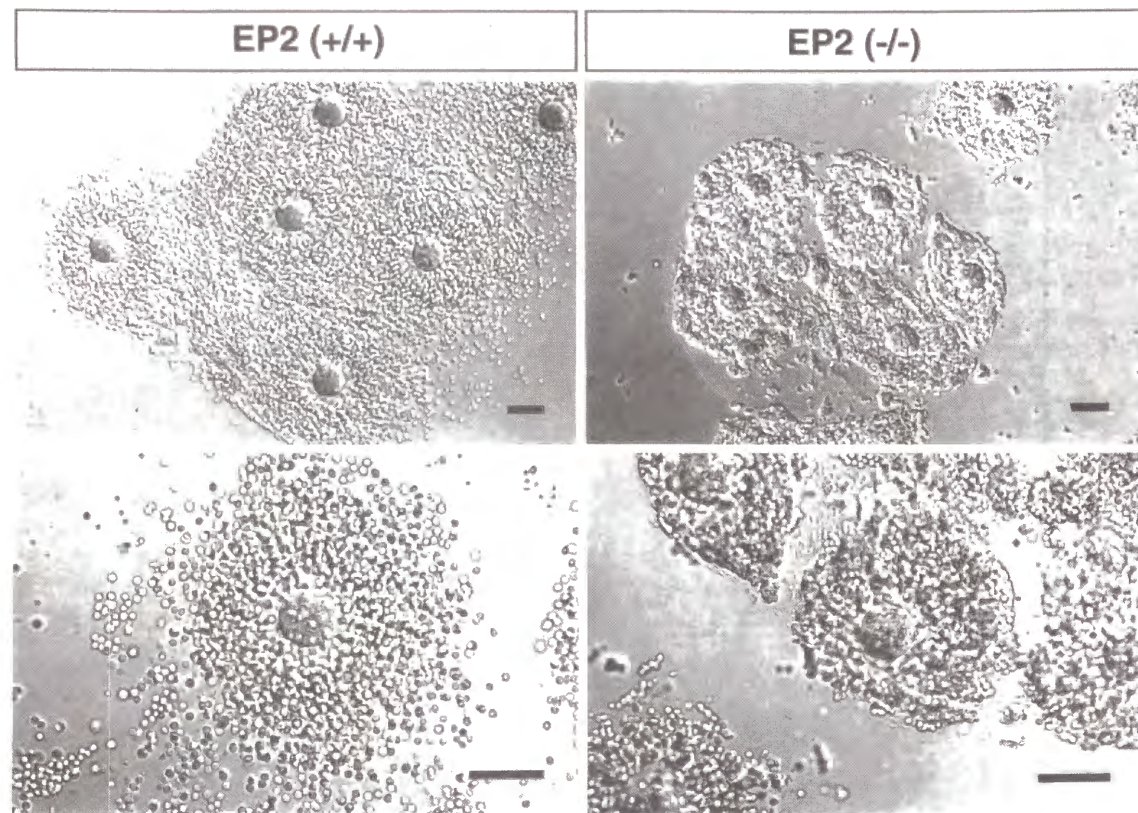


Fig. 18. Abortive cumulus expansion in EP2 (-/-) females. Differential interference contrast photomicrographs of cumulus-oocyte complexes in the postovulatory period are shown. The oviductal postovulatory cumulus-oocyte complexes were isolated from wild-type (left panels) and EP2 (-/-) (right panels) superovulated mice in 12-14 h post-hCG treatment. Bar, 100 μ m.

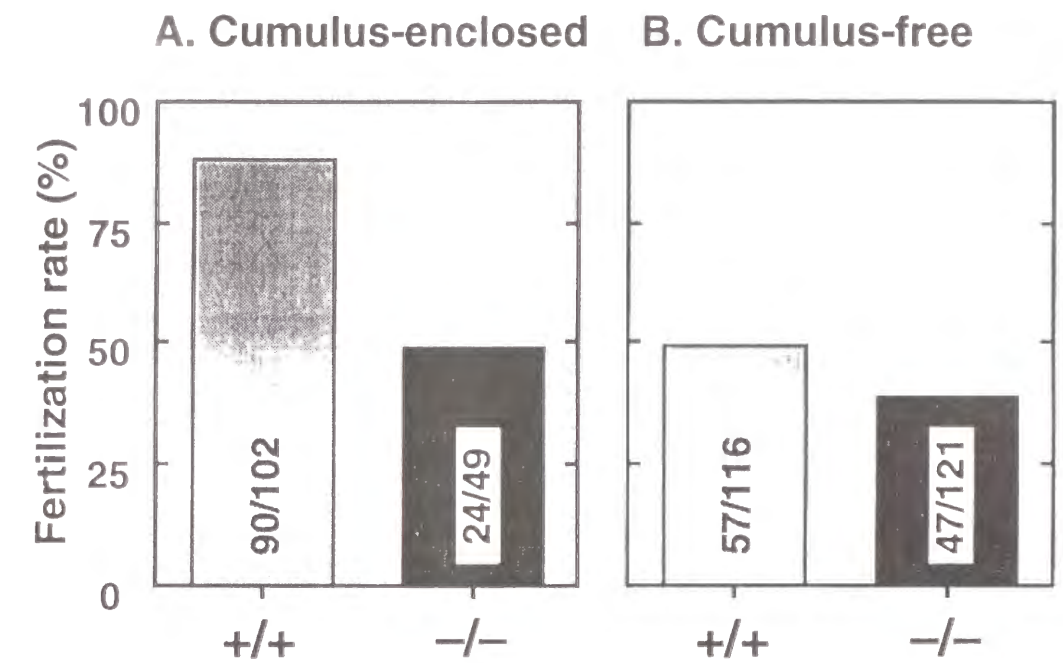


Fig. 19. In vitro fertilization in the presence (A) or absence (B) of cumulus cells. Cumulus-oocyte complexes were collected from oviducts of wild type and EP2 (-/-) mice 14 h after hCG injection. Cumulus-free oocytes were prepared by 0.1% hyaluronidase treatment. After incubation with sperm for 6 h, fertilized eggs were identified by the formation of pronuclei. Numbers within the bars indicate the number of fertilized eggs/total number of eggs.

動脈管開存症と新生児死亡

4 種類の PGE 受容体サブタイプについて、それぞれの受容体サブタイプを欠損するマウスを作製したところ、EP4 受容体欠損マウスは出生後すみやかに死亡に至るという重篤な障害を引き起こすことを見出した。死因として、動脈管の異常を推察した。著者の研究と前後して、Nguyen らは EP4 受容体欠損マウスを作製し、同様の表現型を示すことを報告した (25)。異なる実験条件により作製された EP4 受容体欠損マウスが、同じように動脈管の異常という表現型を示したことは、この表現型が欠損マウスを作製する上での strategy に依存するものではなく、EP4 受容体そのものの欠損によるものであることを強く示唆する。動脈管は胎児期において肺動脈と大動脈をバイパスする血管である (Fig. 20) (26)。胎生期においては、酸素は母胎から胎盤を経由して送られてくるため肺は機能する必要がなく、肺胞は肺胞液で満たされている。そのため、肺血管抵抗の値は高く、右心室から送り出されてきた血液は肺を通過しにくい。胎児の肺血管抵抗は体循環抵抗よりも高いために右心室からの血液の大部分は肺を通過せず動脈管を通り直接全身へ流れ込む（右→左シャント）。生後呼吸を開始することにより肺胞に空気が送り込まれ肺血管抵抗は急激に低下する。それに伴い右心室から送り込まれる血液は肺へ流れ込むようになる。血液中の酸素分圧が上昇するのに伴い動脈管は収縮し、体循環と肺循環が分離される。以上のように動脈管は胎児期においては太く開いていることで胎児型循環の維持を行い、また生後は速やかに肺呼吸型の循環に対応するために閉鎖する。すなわち動脈管は他の大血管系とは異なり出生とそれに伴う循環系の変化に劇的に対応する機能を有している。EP4 受容体欠損マウスは出生後も動脈管の閉鎖がおきないことが判明した。出生後も動脈管が開いてる場合、体循環抵抗が肺循環抵抗よりも高いため、胎児期とは逆に左心室から送り出されてきた血液が動脈管を通り肺へ流入する（左→右シャント） (Fig. 20)。血液は肺から再び左心房・左心室と血液が戻ってくるため、肺・左心房・左心室に高い負荷を与える。肺においては肺血流の増加が肺の換気スペースを

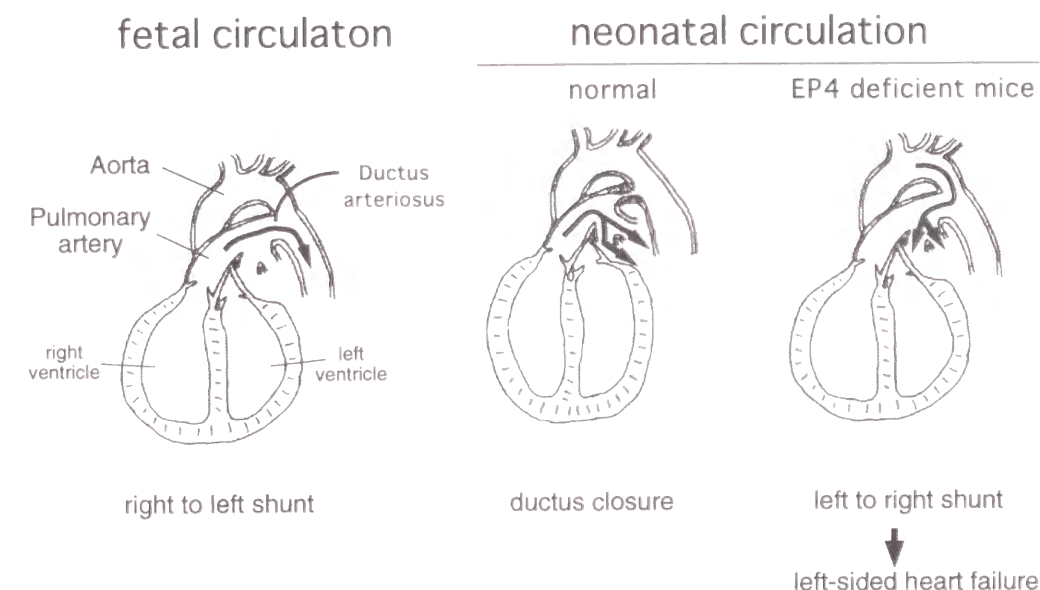


Fig. 20. Model of fetal and neonatal circulations.

減少させるため呼吸状態が悪化する。左心室においては左室不全がおこり肺うっ血、肺浮腫をおこし、呼吸状態を更に悪化させる。また、全身に流れる血液量が減少するため、末梢においては循環不全が引き起こされる。このような所見（肺うっ血、肺動脈・左心室の拡張、末梢循環不全）は実際に EP4 ホモ変異体で観察されており、EP4 受容体欠損マウスは出生後の動脈管の閉鎖不全により、肺のうっ血を伴う左心室不全により死亡したものと考えられる。

動脈管の弛緩に関わるプロスタノイドの役割

従来より妊娠後期の母体にインドメタシンなどの PG 合成阻害剤を投与した場合、胎児の動脈管収縮が起こり、その結果、胎児の肺に高負荷がかかることで出生後肺高血圧症を引き起こすことが知られていた (27, 28)。これらの症例を受けてラットなどを用いて動脈管に対する in vivo でのインドメタシンの作用がこれまでも解析されてきた (9)。ラットにおいてインドメタシンによる収縮は胎生後期の動脈管でおこり出生直前に最も強い収縮を示す。このことは胎児の血中に存在するプロスタノイドが動脈管の弛緩を持続的に引き起こしており、出産直前にはその作用が最大になることを示唆している。また、in vitro ではウサギ動脈管を用いた PGE_2 に対する薬理学検討が行われており、高酸素下で収縮させた動脈管を PGE_2 が濃度依存的に弛緩させる働きを持つことが示されている (8)。PGE 受容体サブタイプの内、血管弛緩に働くものは cAMP 上昇系に共役する EP2, EP4 受容体であり、動脈管の弛緩に関わっているのはこれらの受容体であることが予想される。筆者は動脈管における PGE 受容体の発現を解析し、動脈管には EP4 受容体が動脈管特異的に大量に発現していることを見いだした。一方 EP2 受容体は動脈管にはほとんど発現が認められなかった。このことは PGE_2 に対する動脈管の弛緩作用は EP4 受容体を介している可能性を示唆するものである。また、EP4 受容体欠損マウスの動脈管はインドメタシンに対し収縮を示さなかったことも、EP4 受容体が内在性の PGE_2 による弛緩作用に働いていることを支持するものといえる。胎児において血中のプロスタノイド濃度が新生児と比較して高いことが知られているが (29)、この理由とし

て、胎盤でプロスタノイド合成能が高いこと (30)、また酸素呼吸していないため肺で働く代謝酵素の活性が弱いこと (31) が考えられる。

EP4 受容体欠損マウスの動脈管の性質

EP4 受容体が動脈管の弛緩に働いているのであれば、EP4 受容体欠損マウスの動脈管においてまず予想される表現型として胎児期の動脈管の収縮が考えられる。しかしながら、実際に EP4 受容体欠損マウスで現れた動脈管の異常は生後における動脈管の閉鎖不全であった。このことは EP4 受容体 を欠損した動脈管は単に弛緩作用の欠失にとどまらない性質の変化を起こしていることを示している。

すなわち EP4 受容体欠損マウスの動脈管の性質として次の 2 点が想定される：

- 1) EP4 受容体がないのにも関わらず、胎児期の拡張を維持している。
(拡張作用に関わる他の経路が存在)
- 2) 生後に血中の酸素濃度が上昇しているにも関わらず、動脈管の閉鎖が認められない。
(収縮作用に関わる経路の減弱)

ところで、EP4 受容体以外のプロスタノイド受容体も動脈管の収縮・拡張に関与していることが薬理実験から予想されている (32)。すなわち、EP4 受容体と同様 DP 受容体は弛緩に関与し、また EP3 受容体、TP 受容体は動脈管の収縮に関与している可能性が示唆されている。筆者は EP4 欠損体の動脈管においてプロスタノイド受容体の発現が変化することで動脈管の拡張や収縮能が変化している可能性を考え、動脈管における各受容体の発現を野生型と欠損体で比較した。しかしながら、両者に発現の違いは観察されなかった。従って、EP4 欠損マウスの動脈管の変化はプロスタノイド受容体以外の働きによるものと考えられる。

現在のところ、EP4 受容体欠損マウスの動脈管がどのような性質に変化しているかについての詳細は分かっておらず、今後の課題である。プロスタノイド以外に動脈管の拡張・収縮を調節している因子には、拡張因子としては NO、収縮因子として血中酸素分圧の上昇、エンドセリンなどが知られている (33-35)。この内で血中酸素分圧の上昇によ

る収縮は、大動脈では見られないもので動脈管に特異的な機構が存在すると考えられる。現在のところ、酸素感受性の収縮のメカニズムについての詳細は分かっていないが、4-aminopyridine 感受性の K^+ channel の関与の可能性 (36) が示唆されており、EP4 受容体欠損マウスの動脈管がこれらの因子に対しどのような反応性を持つかは検討されるべき興味深い課題である。

動脈管開存症との関連

臨床において新生児期での動脈管閉鎖不全は動脈管開存症と呼ばれ、未熟児では 10% 以上の頻度で起こる (37)。原因としては、血中のプロスタグランジン量が高いこと、酸素に対する反応性が低いことなどがあげられており、治療法としてはインドメタシン投与が用いられている。しかし、インドメタシンの副作用として腎不全・出血・大腸炎などが存在し、外科的処置を併用することも多い。今回の検討より PGE_2 による動脈管弛緩作用は EP4 受容体が介していると考えられ、より動脈管に選択な薬物として、EP4 アンタゴニストの投与が考えられる。また、肺動脈閉鎖症などの先天性心疾患児では、動脈管が開いていることが生存に必要であり、手術前に PGE_1 を投与することで動脈管を開かせているが、このような場合も EP4 アゴニストを投与することでより副作用が少なくなる可能性が考えられる。

発熱反応における EP3 受容体の役割

外来からの病原性または化学的な刺激に反応して末梢では血球細胞から発熱性物質 ($IL-1\beta$, $IL-6$, $TNF-\alpha$, $IL-8$) が産生される (10)。産生された発熱物質は、血中から中枢へ発熱のシグナルを伝達すると考えられるが、その伝達物質や伝達系路については不明な点が多かった。特に、 PGE_2 は発熱シグナルのメディエーターとして知られていたが、発熱物質との関連やシグナルを伝達する受容体については多くの議論があった。今回の解析により PGE_2 の発熱のシグナルを伝えるのは EP3 受容体であり、発熱性物質である $IL-1\beta$ (内因性), LPS (外因性) による発熱も PGE_2 を介していることが示唆された。中枢に存在する終板器官 (organum vasculosum lamina terminalis; OVLT) 周辺は脳内において微量の PGE_2 を投与した場合、発熱反応を示す領域として知られている (38)。OVLT は血管構造に富み、脳内でも血液脳関門が存在していない領域であり、末梢のシグナルを中枢へ伝達しやすい部位であると考えられる (39)。ラットに LPS や $IL-1\beta$ を静脈投与した場合、OVLT 内の血管内皮細胞に COX-2 の発現が誘導されることが知られている (40-42)。また、 $IL-1$ receptor も OVLT 内の血管内皮細胞に発現が認められており (43)、おそらく血中の $IL-1\beta$ が OVLT 内の $IL-1$ receptor に作用することで COX-2 が誘導され PGE_2 が産生されるものと考えられる。また、マウス中枢において EP3 mRNA の発現が (44)、さらに、ラット中枢において EP3 受容体タンパクの発現が OVLT の周辺に存在するニューロンに認められることが明らかにされ (45)、OVLT 内で産生された PGE_2 はその周辺ニューロンに存在する EP3 受容体を介して発熱のシグナルを惹起すると考えられる。発熱のシグナルは最終的に視床下部に存在する血管作動性中枢に働くものと考えられるが、どのような経路・メカニズムでシグナルが伝達されるかについては今後の課題である。また、中枢において PGE_2 は副腎皮質刺激ホルモンなどの制御にも関与していることが示唆されており (46)、どの受容体を介しているか興味深い。

EP2 受容体欠損マウスを用いて行った解析から、以下のことが明らかとなった。すなわち、

- 1) EP2 受容体欠損雌マウスの 1 回の出産における仔数が減少するが、これは軽度の排卵数の低下と重度な受精率の低下による
- 2) 野生型マウスにおいて、ゴナドトロピン投与は卵丘細胞での EP2 受容体の mRNA の発現を促進する
- 3) PGE_2 は EP2 受容体を介して卵丘細胞の expansion を起こす (in vitro 実験)。
- 4) EP2 受容体欠損マウスでは卵丘細胞の expansion に障害を認める (in vivo 実験)。
- 5) expansion した卵丘細胞は卵の受精能を高め、受精率の上昇に寄与する。

これらのことから、排卵直前期頃から受精期にかけて PGE_2 /EP2 系が卵丘細胞に作用し、expansion の過程に関与することにより受精率の上昇に寄与しているものと考えられる。EP2 欠損マウスでは排卵数の減少が観察され、排卵の過程においても卵丘細胞の expansion が関与するものと考えられる。実際、expansion に伴い産生されるヒアルロン酸は卵胞内圧の上昇に関与し、排卵時に卵を卵巣外に排出するのに機能していると考えられる (47)。しかしながら、EP2 受容体欠損マウスでは、この排卵数減少は顕著なものではなかった。これは卵胞内ではゴナドトロピンも expansion に関与しているため EP2 の欠損による影響が少なかったためと考えられる。一方、受精は卵管内というゴナドトロピンの作用を受けない場であるため、 PGE_2 の作用が顕著に見られたものと考えられる。実際 in situ hybridization による検討で卵管内での卵丘細胞には COX-2 が強く発現していることを確認しており、ホルモンの作用を受けない環境において PGE_2 のようなオータコイドが機能調節を行っている可能性を強く示唆しているものと考えられる。近年、COX-2 の欠損マウスが作製され、これらマウスが排卵・受精の過程に障害を持ち、卵丘細胞の expansion に障害が見られることが示されている (48, 49)。従って、COX-2 欠損マウスの障害の少なくとも一部は EP2 受容体を介するものと考えられる。

筆者は PGE 受容体欠損マウスの作製とその表現型に関する解析を行い、次の成果を得た。

- 1 4 種類の PGE 受容体欠損マウスを作製したところ、外観上では、EP1、EP2、EP3 受容体欠損マウスは野生型マウスとの間に顕著な違いが観察されなかった。しかし、EP4 受容体欠損マウスはその 95% が出生後数日以内の新生児で死亡することを発見した。
- 2 EP4 受容体欠損マウスの死亡原因は、胎児期循環系である動脈管の閉鎖不全による血液循環の異常による肺組織傷害にあることを示唆した。また、出生直前の胎児動脈管には EP4 受容体 mRNA と COX-2 mRNA が大量に発現していることを見だし、 PGE_2 は EP4 受容体を介して動脈管の収縮・弛緩反応を制御している可能性を示唆した。
- 3 EP3 受容体欠損マウスは発熱機構に異常が存在することを見出した。この機構を解析し、 PGE_2 による発熱は EP3 受容体を介していること、また外因性・内因性発熱物質による発熱も PGE_2 を脳内の最終メディエーターとしていることを示唆した。
- 4 EP2 欠損マウスは排卵・受精の過程で異常が存在することを明らかにした。この機構を解析し、 PGE_2 は EP2 受容体を介して排卵・受精の過程に重要な卵-卵丘細胞複合体の卵丘細胞の expansion に関与していることを明らかとした。さらに、 PGE_2 がゴナドトロピンと協調し排卵・受精の過程に寄与していることを示唆した。

PGE 受容体の 4 種類のサブタイプ受容体の内、EP1 受容体欠損マウスはいまだ報告はないが、薬物誘発による癌組織の発生・増殖に異常のあることが見出されている (62)。これら PGE 受容体サブタイプ欠損マウスの主な表現型はもっとも典型的なものであり、今後さらに多くの興味ある表現型が見出される可能性がある。その理由は、 PGE_2 が生

体内でもっとも大量に産生され、その働きを伝達する受容体には4種類のサブタイプがあり、組織に幅広く発現しているからである。それゆえ、本論文で取り扱った表現型にかかわる組織以外にも、全身の様々な組織において、EP受容体サブタイプの欠損による細胞機能の異常のあることが考えられる。また、4種類のEP受容体サブタイプは、同一細胞内で共存して発現している場合も多く、複数の受容体が相互にシグナルの増幅、消去を行っている可能性も考えられる。今後、サブタイプ相互間の協調作用、EP受容体サブタイプと他のホルモンあるいはオータコイド間の協調作用などが、より詳細に分子レベルで解析されることにより、それに応じた個体レベルでの生体作用が見出されることも予想される。さらに、表現型の解析結果がプロスタノイドの関与する病態モデルの作製に繋がることが期待される。

実験方法の部

(1) ターゲティングベクターの構築

マウス 129 / Sv の genome DNA ライブラリーより単離したPGE受容体遺伝子(50-53)を用い、その制限酵素地図の作製及び塩基配列の解析を行った。主要なコーディング領域(EP1、EP4受容体は第2エキソン、EP2、EP3受容体は第1エキソン)を欠失標的とした。欠失部位に組み換え体の選別のためのマーカー遺伝子であるネオマイシン耐性遺伝子(Neo)を挿入(EP1)、置換(EP2、EP3、EP)することとした。また、genome DNAとの相同領域外にもう1つのマーカー遺伝子である単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ(Tk)遺伝子(54)を導入しすることとした。以上のように相同組み換えを目的とするターゲティングベクターをデザインし(Fig. 3)、これを作製した。

(2) PGE受容体欠損マウスの作製

Tanaka (55) 及びKawabe (56) らの方法に準じて作製を行った。構築したベクターDNA 20 μ gをエレクトロポレーション法(500 μ F, 230V, 0.4cm cuvette)でE14-1 koln Embryonic Stem (ES) 細胞 1×10^7 cells に導入した。ES細胞は、単層のフィーダー細胞(primary embryonic fibroblast)上に播き、15% FCSと 1×10^3 U/ml leukemia inhibitory factorを含むES細胞用mediumを添加して培養された。トランスフェクション24時間後より400 μ g/ml neomycin, 2 μ M gancyclovirでダブルセクションした。トランスフェクション10日後にコロニーを拾い、これらのES細胞の一部からgenome DNAを抽出してPCR法により相同組み換え体の選別を行った。さらに、これらの変異ES細胞はサザンブロッティング法により相同組み換えの確認がなされた。この結果、得られたクローンをマウス(C57BL/6)の胚盤胞にマイクロインジェクションし、仮親マウス(ICR)の子宮内で発生させてキメラマウスを作製した。次に、雄のキメラマウスを雌の野生型マウス(C57BL/6)と交配させることにより、遺伝的バックグラウンドがC57BL/6で、2コピー

の genome DNA のうち 1 コピーの遺伝子にのみ変異をもつ F1 ヘテロマウスを得た。この F1 ヘテロ変異マウス同士の交配によって得られた F2 マウス（野生型、ヘテロ変異体、ホモ変異体）を解析に使用した。なおマウスは、SPF 環境下で市販の固形飼料と水道水を与えて飼育・繁殖させた。

（3）PGE 受容体欠損マウスの同定・確認

マウス遺伝子型は、マウス尾部より genome DNA を抽出し、制限酵素 (Eco RI [EP1], Sca I [EP2], Eco RV [EP3], Nsi I [EP4]) で切断し、サザンブロッティング法により解析した。プローブは Fig. 3 に示しているものを用いた。また、各々の遺伝子型マウス新生児の腎臓 (EP1、EP3)・偽妊娠 5 日目の子宮 (EP2)・小腸 (EP4) から total RNA を調製し、PGE 受容体 mRNA の発現をノザンブロッティング法により解析した。

（4）組織解析

肺の組織解析には、胎仔・新生児をブアン液で 3 日間固定後、70% エタノールに移したものをを用いた。肺はパラフィン包埋後 5 μ m に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。また、動脈管の形態変化や in situ hybridization 用には、-80°C に冷やしたイソペンタンで胎仔・新生児を凍結し、胸部を水平にクリオスタット (Leica, CM3000) を用いて 10 μ m に薄切した (57)。形態変化用のものはメタノール固定後ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。in situ hybridization 用の切片は poly-L-lysine コートをしたスライドガラスにマウントし、4% ホルマリン/PBS 固定 10 分間後、PBS 洗浄を行い、0.1 M トリエタノールアミン/0.9% NaCl 溶液中で 0.25 % 無水酢酸処理を室温で 10 分間行いアセチル化した。70%, 95%, 100% エタノールで脱水後、使用時まで -80°C で保存した。

（5）in situ hybridization

Sugimoto (58) らの方法に準じた。リボプローブは直鎖状にしたプロスタノイド受容体、COX-1, -2 の cDNA (59) を鋳型として用い、T3 もしくは T7 RNA polymerase (Stratagene)

を用いて [35 S] CTP α S 存在下で antisense RNA を合成した。合成したリボプローブは平均 150 塩基長になるようアルカリ加水分解を行った。ハイブリダイゼーションは 5 X SSC, 50% formamide, 5 X Denhardt's solution, 0.2% SDS, 0.05 M sodium phosphate (pH 6.5), 250 μ g/ml heat-denatured salmon sperm DNA, 200 μ g/ml yeast transfer RNA 溶液中に 1.5 X 10⁵ cpm/ml になるよう 35 S ラベルしたリボプローブを加え、60°C で 6 時間行った。洗浄操作は 2 X SSC, 10 mM β -mercaptoethanol 下で 60°C, 1 時間行い、室温にまで放冷した。0.5 M NaCl, 10 mM Tri-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA 溶液中で 20 μ g/ml RNase A 処理を行い、その後 0.1 X SSC, 10 mM β -mercaptoethanol 下で 60°C, 1 時間洗浄操作を行った。エタノール系列で脱水後、切片を NTB3 エマルジョン (Kodak) に浸し、4°C で 6 週間感光させた。現像は Kodak D-19 developer を用い、その後ヘマトキシリン・エオジンで後染色を行った。シグナルの特異性は過剰量の非ラベルプローブを加えることによってシグナルが消失することで確認した。

（6）体温測定

直腸温度は digital thermometer (TD-300, Shibuura Electronics) を用いて、プローブを肛門から直腸へ 3 cm 程度挿入することによって測定した。PGE₂ 1 nM を 5% エタノールを含む生理食塩水中 5 μ l で溶解させ、27 ゲージ針で脳室内 (bregma 後方 0.5 mm, 正中線側方 0.7 mm, 深さ 3 mm) に投与した。LPS は E. coli 由来 026:B6 (Sigma) を生理食塩水に溶解し、10 mg/kg 静脈注射した。マウスリコンビナント IL-1 β (Pepro Tek) は PBS に溶解し、静脈注射では 100 ng、脳室内投与では 10 ng 投与した。脳室内投与の場合はマウスにエーテル麻酔を施して投与を行い、覚醒させた後マウスホルダーに固定して体温測定した。静脈内投与の場合は、拘束ストレスによる発熱反応の観察 (60) を避けるためマウスをホルダー内に 2 時間程度固定し、体温を安定させた後投与を行った。

（7）出産数・排卵・受精率

性周期は膣スメア法により解析した。自然排卵とその受精は雄の C57BL/6 と交配させ

て行った。過排卵処理は 4 週齢の雌に PMSG (5 unit/mouse)を腹腔内投与し、その 48 時間後に hCG (5 unit/mouse) を同じく腹腔内投与し、雄と一晩交配させた。妊娠日は膣栓を認めた日を妊娠 1 日目とした。卵は妊娠 1 日目に卵管内から生理食塩水で回収し、顕微鏡下で観察した。受精は前核形成を指標とした。有意差は Student's t test 法を用いて検討した。

(8) in vitro expansion

3.5 週齢の雌マウスに PMSG 投与を行い、48 時間後に卵巢のグラーフ卵胞から 27 ゲージ針で卵-卵丘細胞複合体を 30 mg/ml BSA を含む PBS で回収した。洗浄後、5% FBS を含む Eagle's minimum essential medium に移し、FSH (500 ng/ml), PGE₂ (1 μM), dbcAMP (2 mM) を添加し、5% CO₂ 下 37°C で 18-20 時間インキュベーションした。expansion の程度は微分干渉顕微鏡下で観察した。in vivo による expansion は hCG 処理後 14 時間で卵管から卵-卵丘細胞複合体を回収し、形態を観察した。

(9) in vitro fertilization

Hoganらの方法に準じた(61)。雄マウスの精巣上体を摘出し、針でつつき精子を押し出した。ミネラルオイル中にBSAを含むα-modification of Eagle's mediumの小滴を入れ、その中に精子を入れ 5% CO₂ 下 37°C で 2 時間インキュベーションした。卵管から回収した卵-卵丘細胞複合体を α-modification of Eagle's medium の小滴に入れ、その中にインキュベーションした精子を 200 sperm/μl になるように添加した。6-12 時間インキュベーションした後に formalin 固定し前核形成を観察した。卵から卵丘細胞を除くために、0.1% ヒアルロニダーゼ処理を行った。

謝辞

本研究の終わりに臨み、本研究の機会を賜りまた終始有益な御助言ならびに御指導を賜りました、京都大学大学院薬学研究科 市川 厚教授に謹んで感謝の意を表します。

また本研究の全般を通じて直接の御指導を賜り常に励まして頂いた、京都大学大学院薬学研究科 杉本 幸彦助教授に深く感謝致します。本研究の全般にわたり貴重な御助言を賜りました、京都大学大学院医学研究科 成宮 周教授に深く感謝致します。

更に、本研究に当たり終始的確な御助言を頂いた、京都大学大学院生命科学研究科 根岸 学教授、旭川医科大学 牛首 文隆教授、東京医科学研究所 吉田 進昭教授に深く感謝致します。

また、本研究において直接ご指導いただいた、東京都臨床医学総合研究所 入江 敦博士、京都大学大学院薬学研究科 田中 智之助手、小野薬品安全性研究所 阿瀬 善也博士、滋賀医科大学 広瀬 雅也先生、科研製薬研究所 村田 隆彦先生、京都大学大学院医学研究科 小林 拓也助手、松岡 俊行先生、京都府立医科大学 勝山 真人助手に深く感謝いたします。本研究にご協力していただいた、山崎 敦修士、樋崎 寛子修士、坪井 一人修士、山根 英修士、日下部 杜央修士、ポピエル 明子修士、大和 美智子学士、佐治 知美学士、辻 正幸学士、原口 佳代学士、論文作製にご協力いただいた、寺井 佐知子学士、また、常に励まし、切磋琢磨していただいた教室員すべての方に深く感謝いたします。

発表論文目録

本研究の一部は以下の論文に公表した。

Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin E receptor EP4-deficient mice

Biochem. Biophys. Res. Commun., **246**; 7-12, 1998

Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3

Nature, **395**; 281-284, 1998

Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP2

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**; 10501-10506, 1999

参考文献

1. Moncada, S., Flower, R.J., and Vane, J.R. (1985) Prostaglandins, prostacyclin, thromboxane A₂, and leukotriens. in: The Pharmacological Basis of Therapeutics (Gilman, A.G., Good-man, L. S., Rall, T.W., and Murad, F., ads) 7th Ed., pp.660-673, Macmillan Publishing Co., New York.
2. Coleman, R.A., Kennedy, I., Humphrey, P. P. A., Bunce, K., and Lumley, P. (1990) Prostanoids and their receptors. in: Comprehensive Medicinal Chemistry (Hansch, C., Sammes, P. G., Taylor, J. B. and Emmett, J. C. eds) Vol.3, pp. 643-714 pergaman, Oxford.
3. Coleman, R. A., Grix, S. P., Head, S. A., Louttit, J. B., Mallett, A., Sheldrick, R. L. (1994) A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. Prostaglandins 47, 151-168.
4. Narumiya, S., Sugimoto, Y. and Ushikubi, F. (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. Pharmacol. Rev. 79, 1193-1226.
5. Segi, E., Sugimoto, Y., Yamasaki, A., Aze, Y., Oida, H., Nishimura, T., Murata, T., Matsuoka, T., Ushikubi, F., Hirose, M., Tanaka, T., Yoshida, N., Narumiya, S., Ichikawa, A. (1998) Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP4-deficient mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 246, 7-12.
6. Ushikubi, F., Segi, E., Sugimoto, Y., Murata, T., Matsuoka, T., Kobayashi, T., Hizaki, H., Tsuboi, K., Katsuyama, M., Ichikawa, A., Tanaka, T., Yoshida, N., Narumiya, S. (1998) Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. Nature 395, 281-284.
7. Hizaki, H., Segi, E., Sugimoto, Y., Hirose, M., Saji, T., Ushikubi, F., Matsuoka, T., Noda, Y., Tanaka, T., Yoshida, N., Narumiya, S., Ichikawa, A. (1999) Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 10501-10506.
8. Smith ,G. C., Coleman, R. A., McGrath, J. C. (1994) Characterization of dilator prostanoid receptors in the fetal rabbit ductus arteriosus. J. Pharmacol. Exp. Ther. 271, 390-396.
9. Momma, K., Takao, A. (1987) In vivo constriction of the ductus arteriosus by nonsteroidal antiinflammatory drugs in near-term and preterm fetal rats. Pediatr. Res. 22, 567-572.
10. Kluger, M. J. (1991) Fever: role of pyrogens and cryogens. physiol. Rev. 71, 93-127.
11. Milton, A. S. and Wendlandt, S. (1970) A possible role for prostaglandin E₁ as a modulator for temperature regulation in the central nervous system of the cat. J. Physiol. 207, 76-77.
12. Stitt, J. T. (1986) Prostaglandin E as the neural mediator of the febrile response. Yale J. Biol. Med. 59, 137-149.
13. Mitchell, D., Laburn, H. P., Cooper, K. E., Hellon, R. F., Cranston, W. I., Townsend, Y. (1986) Is

- prostaglandin E the neural mediator of the febrile response? The case against a proven obligatory role. *Yale J. Biol. med.* 59, 159-168.
14. Saper, C. B. and Breder, C. D. (1994) The neurologic basis of fever. *N. Engl. J. Med.* 330, 1880-1886.
 15. Milton, A. S. (1989) Thermoregulatory actions of eicosanoids in the central nervous system with particular regard to the pathogenesis of fever. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 559, 392-410.
 16. Zheng, H., Fletche, D., Kozak, W., Jiang, M., Hofmann, K. J., Conn, C. A., Soszynski, D., Grabiec, C., Trumbauer, M. E., Shaw, A. (1995) Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 beta-deficient mice. *Immunity* 3, 9-19.
 17. Kozak, W., Zheng, H., Conn, C. A., Soszynski, D., van der Ploeg, L. H., Kluger, M. J. (1995) Thermal and behavioral effects of lipopolysaccharide and influenza in interleukin-1 beta-deficient mice. *Am. J. Physiol.* 269, R969-R977.
 18. Katsuyama, M., Sugimoto, Y., Morimoto, K., Hasumoto, K., Fukumoto, M., Negishi, M., Ichikawa, A. (1997) Distinct cellular localization of the messenger ribonucleic acid for prostaglandin E receptor subtypes in the mouse uterus during pseudopregnancy. *Endocrinology* 138, 344-350.
 19. Sirois, J., Simmons, D. L., Richards, J.S. (1992) Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. Induction in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 267, 11586-11592.
 20. Sirois, J. (1994) Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinology* 135, 841-848.
 21. Eppig, J. J. (1979) FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* 281, 483-484.
 22. Tsafiriri, A. (1995) Ovulation as a tissue remodelling process. proteolysis and cumulus expansion. *Adv. Exp. Med. Biol.* 377, 121-140.
 23. Salustri, A., Yanagishita, M., Hascall, V. C. (1990) Mouse oocyte regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells. *Dev. Biol.* 138, 26-32.
 24. Eppig, J. J. (1981) Prostaglandin E2 stimulates cumulus expansion and hyaluronic acid synthesis by cumuli oophori isolated from mice. *Biol. Reprod.* 25, 191-195.
 25. Nguyen, M., Camenisch, T., Snouwaert, J. N., Hicks, E., Coffman, T. M., Anderson, P. A., Malouf, N. N., Koller, B. H. (1997) the prostaglandin receptor EP4 triggers remodelling of the cardiovascular system at birth. *Nature* 390, 78-81.
 26. Heymann, M. A., Rudolph, A. M. (1975) Control of ductus arteriosus. *Physiol. Rev.* 55, 62-78.
 27. Levin, D. L. (1980) Effects of inhibition of prostaglandin synthesis on fetal development, oxygenation, and the fetal circulation. *Semin. Perinatol.* 4, 35-44.
 28. Velvis, H., Moore, P., Heymann, M. A. (1991) Prostaglandin inhibition prevents the fall in pulmonary vascular resistance as a result of rhythmic distension of the lungs in fetal lambs. *Pediatr. Res.* 30, 62-68.
 29. Challis, J. R., Dilley, S. R., Robinson, J. S., Thorburn, G. D. (1976) Prostaglandin in the circulation of the fetal lamb. *Prostaglandins* 11, 1041-1052.
 30. Gibb, W., Matthews S. G., Challis J. R. (1996) Localization and developmental changes in prostaglandin H synthase (PGHS) and PGHS messenger ribonucleic acid in ovine placenta throughout gestation. *Biol. Reprod.* 54, 654-659.
 31. Clyman, R. I., Mauray, F., Heymann, M. A., Roman, C. (1981) Effect of gestational age on pulmonary metabolism of prostaglandin E1 & E2. *Prostaglandins* 21, 505-513.
 32. Smith, G. C., McGrath, J. C. (1995) Contractile effects of prostanoids on fetal rabbit ductus arteriosus. *J. cardiovasc. Pharmacol.* 25, 113-118.
 33. Coceani, F., Kelsey, L., Seidlitz, E. (1994) Occurrence of endothelium-derived relaxing factor-nitric oxide in the lamb ductus arteriosus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72, 82-88.
 34. Coceani, F., Kelsey, L. (1991) Endothelin-1 release from lamb ductus arteriosus: relevance to postnatal closure of the vessel. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69, 218-221.
 35. Momma, K., Toyono, M. (1999) The role of nitric oxide in dilating the fetal ductus arteriosus in rats. *Pediatr. Res.* 46, 311-315.
 36. Tristani-Firouzi, M., Reeve, H. L., Tolarova, S., Weir, E. K., Archer, S. L. (1996) Oxygen-induced constriction of rabbit ductus arteriosus occurs via inhibition of a 4-aminopyridine-, voltage-sensitive potassium channel. *J. Clin. Invest.* 98, 1959-1965.
 37. Gersony, W. M. (1986) Patent ductus arteriosus on the neonate. *Pediatr. Clin. North. Am.* 33, 545-560.
 38. Elmquist, J. K., Scammell, T. E., Saper, C. B. (1997) Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. *Trends Neurosci.* 20, 565-570.
 39. Stitt, J. T. (1985) Evidence for the involvement of the organum vasculosum laminae terminalis in the febrile response of rabbits and rats. *J. Physiol.* 368, 501-511.
 40. Cao, C., Matsumura, K., Yamagata, K., Watanabe, Y. (1995) Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response. *Brain Res.* 697, 187-196.
 41. Cao, C., Matsumura, K., Yamagata, K., Watanabe, Y. (1996) Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1 beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. *Brain Res.* 733, 263-272.
 42. Matsumura, K., Cao, C., Azaki, M., morii, H., Nakadate, K., Watanabe, Y. (1998) Brain endothelial cells express cyclooxygenase-2 during lipopolysaccharide-induced fever: light and electron microscopic

- immunocytochemical studies. *J. Neurosci.* 18, 6279-6289.
43. Yabuuchi, K., Minami, M., Katsumata, S., Satoh, M. (1994) Localization of type I interleukin-1 receptor mRNA in the rat brain. *Mol. Brain Res.* 27, 27-36.
 44. Sugimoto, Y., Shigemoto, R., Namba, T., Negishi, M., Narumiya, S., Ichikawa, A. (1994) Distribution of the messenger RNA for the prostaglandin E receptor subtype EP3 in the mouse nervous system. *Neuroscience* 62, 919-928.
 45. Nakamura, K., Kaneko, T., Yamashita, Y., Hasegawa, H., Katoh, H., Ichikawa, A., Negishi, M. (1999) Immunocytochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 260, 117-120.
 46. Katsuura, G., Arimura, A., Koves, K., Gottschall, P. E. (1990) Involvement of organum vasculosum of lamina terminalis and preoptic area in interleukin - beta-induced ACTH release. *Am. J. Physiol.* 258, E163-171.
 47. Chen, L., Russell, P. T., Larsen, W. J. (1993) Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Mol. Reprod. Dev.* 34, 87-93.
 48. Lim, H., Paria, B. C., Das, S. K., Dinchuk, J. E., Langenbach, R., Trzaskos, J. M., Dey, S. K. (1997) Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 91, 197-208.
 49. Davis, B. J., Lennard, D. E., Lee, C. A., Tiano, H. F., Morham, S. G., Wetsel, W. C., Langenbach, R. (1999) Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1 beta. *Endocrinology* 140, 2685-2895.
 50. Watabe, A., Sugimoto, Y., Honda, A., Irie, A., Namba, T., Negishi, M., Ito, S., Narumiya, S. and Ichikawa, A. (1993) Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 20175-20178.
 51. Katsuyama, M., Nishigaki, N., Sugimoto, Y., Morimoto, K., Negishi, M., Narumiya, S. and Ichikawa, A. (1995) The mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype: cloning, expression, and northern blot analysis. *FEBS Lett.* 372, 151-156.
 52. Sugimoto, Y., Namba, T., Honda, A., Hayashi, Y., Negishi, M., Ichikawa, A. and Narumiya, S. (1992) Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *J. Biol. Chem.* 267, 6463-6466.
 53. Honda, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Watabe, A., Irie, A., Negishi, M., Narumiya, S. and Ichikawa, A. (1993) Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype. *J. Biol. Chem.* 268, 7759-7762.
 54. Mansour, S. L., Thomas, K. R., Capecchi, M. R. (1988) Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336, 348-352.
 55. Tanaka, T., Akira, S., Yoshida, K., Umemoto, M., Yoneda, Y., Shirafuji, N., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T. (1995) Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacterial killing and tumor cytotoxicity by macrophages. *Cell* 80, 353-361.
 56. Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., Kikutani, H. (1994) The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1, 167-178.
 57. Homblad, P. Y. (1969) Embryological observation of the ductus arteriosus in the guinea-pig, rabbit, rat and mouse. Studies on closure of the ductus arteriosus. IV. *Acta. Physiol. Scand.* 76, 49-57.
 58. Sugimoto, Y., Namba, T., Shigemoto, R., Negishi, M., Ichikawa, A., Narumiya, S. (1994) Distinct cellular localization of mRNAs for three subtypes of prostaglandin E receptor in kidney. *Am. J. Physiol.* 266, F823-828.
 59. Yamamoto, K., Arakawa, T., Ueda, N., Yamamoto, S. (1995) Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.* 270, 31315-31320.
 60. Morley, R. M., Conn, C. A., Kluger, M. J., Vander, A. J. (1990) Temperature regulation in biotelemetered spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 258, R1064-1069.
 61. Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lucy, E. (1994) in manipulating the mouse embryo: a laboratory manual Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, New York.
 62. Watanabe, K., Kawamori, T., Nakatsugi, S., Ohta, T., Ohuchida, S., Yamamoto, H., Maruyama, T., Kondo, K., Ushikubi, F., Narumiya, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K. (1999) Role of the prostaglandin E receptor subtype EP1 in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 59, 5093-5096.